

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 622**

51 Int. Cl.:

**C12N 7/00** (2006.01)

**C07K 14/11** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**C12N 15/63** (2006.01)

**C12N 15/87** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2000 E 10011896 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015 EP 2345716**

54 Título: **Virus de la gripe recombinantes para vacunas y terapia génica**

30 Prioridad:

**06.04.1999 US 127912 P**

**06.05.1999 US 132839 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**13.04.2015**

73 Titular/es:

**WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION  
(100.0%)**

**614 Walnut Street  
Madison, WI 53705, US**

72 Inventor/es:

**KAWAOKA, YOSHIHIRO y  
NEUMANN, GABRIELE**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 533 622 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Virus de la gripe recombinantes para vacunas y terapia génica

**Antecedentes de la invención**

5 La capacidad para generar virus de ARN infecciosos a partir de ADNc clonados ha contribuido en gran medida al conocimiento biológico de estos patógenos y, por tanto, a mejorar los procedimientos de control de enfermedades (Palese y col., 1996). Sin embargo, este progreso ha sido relativamente limitado para los virus de ARN con sentido negativo en comparación con los virus de ARN con sentido positivo, ya que ni el ARN viral (ARNv) genómico ni el ARN complementario antígenómico (ARNc) de virus de ARN con sentido negativo pueden servir como molde directo para la síntesis de proteínas. Más bien, el ARNv, tras su encapsulación por nucleoproteínas (NP) virales, debe transcribirse a ARNm con sentido positivo mediante el complejo de la ARN polimerasa viral. Por tanto, la unidad mínima de replicación está formada por el ARNv genómico formando complejo con las NP y las proteínas de la polimerasa. A pesar de estos obstáculos, se han establecido procedimientos de genética inversa para producir virus de ARN con sentido negativo no segmentados, incluyendo el virus de la rabia (Snell y col., 1994), virus de la estomatitis vesicular (Lawson y col., 1995; Whelan y col., 1995), virus del sarampión (Radecke y col., 1995), virus respiratorio sincitial (Collins y col., 1995), virus Sendai (Garcin y col., 1995; Kato y col., 1996), virus de la peste bovina (Baron y col., 1997), virus de la parainfluenza humana de tipo 3 (Hoffman y col., 1997) y SV5 (He y col., 1997).

10 Las familias *Orthomyxoviridae*, *Arenaviridae* y *Bunyaviridae* contienen genomas de ARN con cadena negativa segmentado e incluyen varios patógenos humanos y animales, por ejemplo, los virus de la gripe de tipos A, B y C (*Orthomyxoviridae*), virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) (*Arenaviridae*) y virus de la encefalitis y de la fiebre hemorrágica (*Bunyaviridae*, *Arenaviridae*). Sus genomas están compuestos de dos (*Arenaviridae*), tres (*Bunyaviridae*) o de seis a ocho (*Orthomyxoviridae*) moléculas de ARN de cadena sencilla de polaridad negativa (complementarias al ARNm). Los ARNv interactúan con NP y con la ARN polimerasa dependiente de ARN viral para formar complejos ribonucleoproteína (RNP). Los RNP se rodean de una bicapa lipídica derivada de la célula hospedadora. En esta envuelta se insertan glucoproteínas virales, que esencialmente son para la unión al receptor y la entrada en la célula hospedadora. De este modo, la generación de virus de ARN con sentido negativo segmentado a partir de ADNc clonado supone un desafío formidable, ya que tiene que producirse un ARNv separado para cada segmento génico.

15 20 Bridgen y Elliott (1996) produjeron un virus Bunyamwera (familia *Bunyaviridae*) a partir de ADNc clonado que codificaba tres segmentos del ARNv con sentido positivo antígenómico. Sin embargo, la eficacia de recuperación del virus era baja. Ninguno de los ortomixovirus, que contienen seis (thogotovirus), siete (virus de la gripe C) u ocho (virus de la gripe A y B) segmentos de ARN con sentido negativo se han producido por completo a partir de ADNc clonado. Esta demora en el progreso se ha dejado notar más intensamente en los esfuerzos para controlar las infecciones por el virus de la gripe.

25 30 35 Palese y colaboradores (Enami y col., 1990) han sido pioneros en sistemas de genética inversa dependientes de virus auxiliares para el virus de la gripe A (Figura 1A). En sus aproximaciones, los complejos RNP se generan mediante la síntesis del ARNv *in vitro* en presencia de polimerasa purificada y de proteínas NP y, a continuación, se utilizan para transfectar células eucariotas. La infección posterior con el virus auxiliar de la gripe A da lugar a la generación de virus que poseen un gen derivado del ADNc clonado. Un segundo procedimiento, desarrollado por Neumann y col. (1994), se basa en la síntesis *in vivo* de ARNv mediante la ARN polimerasa I (Figura 1B), una enzima celular que transcribe el ARN ribosómico que carece tanto de la caperuza 5' como de la cola poli A 3'. Las células infectadas con el virus de la gripe y transfectadas con un plásmido que contiene el ADNc del virus de la gripe clonado, flanqueado por las secuencias promotora y terminadora de la ARN polimerasa I murina, condujeron a la producción de virus transfectantes. Sin embargo, con ambos procedimientos deben seleccionarse transfectantes a partir de un extenso fondo de virus auxiliares, lo que requiere un potente sistema de selección y complica la generación de virus con crecimiento defectuoso.

40 45 50 Mena y col. (1996) desarrollaron un sistema para generar partículas similares a virus (PSV) incompetentes para la replicación, en el que se transcribe *in vitro* un gen indicador que codifica un ARNv similar al virus de la gripe y se transfecta en células eucariotas. Todas las diez proteínas del virus de la gripe se expresan a partir de plásmidos bajo el control de un promotor de la ARN polimerasa T7. Cuando las células transfectadas se infectan con un virus de la variolovacuna recombinante que expresa la ARN polimerasa T7, producen PSV de la gripe. Sin embargo, la eficacia del sistema es baja: en el 25 % de los experimentos, los investigadores no consiguieron detectar una expresión del gen indicador. Además, el virus de la variolovacuna expresa más de 80 proteínas, cualquiera de las cuales podría afectar al ciclo vital del virus de la gripe.

55 Por tanto, lo que es necesario es un procedimiento para preparar virus de ARN con cadena negativa segmentado, por ejemplo, ortomixovirus, tales como los virus de la gripe A, completamente a partir de ADNc clonados.

**Resumen**

La presente invención se refiere a las realizaciones como se define en las reivindicaciones. En particular, la

invención se refiere a una célula puesta en contacto con una pluralidad de vectores del ortomixovirus, que comprende:

- (i) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de PA del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción,
  - 5 (ii) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de PB1 del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción,
  - (iii) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de PB2 del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción,
  - 10 (iv) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de HA del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción,
  - (v) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de NP del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción,
  - (vi) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de NA del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción,
  - 15 (vii) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de M del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción,
  - (viii) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de NS del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción,
  - 20 (ix) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica un polipéptido PA de la gripe y unido a una secuencia de terminación de la transcripción,
  - (x) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica un polipéptido PB1 de la gripe y unido a una secuencia de terminación de la transcripción,
  - (xi) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica un polipéptido PB2 de la gripe y unido a una secuencia de terminación de la transcripción, y
  - 25 (xii) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica un polipéptido NP de la gripe y unido a una secuencia de terminación de la transcripción
- en la que dicha célula expresa el ortomixovirus. La invención se refiere adicionalmente a una célula puesta en contacto con una pluralidad de vectores del ortomixovirus que comprende:
- 30 (i) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de PA del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción,
  - (ii) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de PB1 del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción,
  - (iii) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de PB2 del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción,
  - 35 (iv) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a ADNc de HA del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción,
  - (v) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de NP del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción,
  - (vi) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de NA unido a una secuencia de terminación de la transcripción,
  - 40 (vii) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de M del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción,
  - (viii) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de NS del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción,
  - 45 (ix) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica un polipéptido PA de la gripe y unido a una secuencia de terminación de la transcripción,
  - (x) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica un

polipéptido PB1 de la gripe y unido a una secuencia de terminación de la transcripción,

(xi) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica un polipéptido PB2 de la gripe y unido a una secuencia de terminación de la transcripción,

5 (xii) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica un polipéptido NP de la gripe y unido a una secuencia de terminación de la transcripción

(xiii) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica un polipéptido HA del virus de la gripe y unido a una secuencia de terminación de la transcripción,

(xiv) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica un polipéptido NA del virus de la gripe y unido a una secuencia de terminación de la transcripción,

10 (xv) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica un polipéptido M1 del virus de la gripe y unido a una secuencia de terminación de la transcripción,

(xvi) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica un polipéptido M2 del virus de la gripe y unido a una secuencia de terminación de la transcripción, y

15 (xvii) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica un polipéptido NS2 del virus de la gripe y unido a una secuencia de terminación de la transcripción.

en la que dicha célula expresa el ortomixovirus.

La divulgación también proporciona al menos uno de los siguientes vectores aislados y purificados: un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de PA del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de PB1 del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de PB2 del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de HA del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de NP del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de NA unido a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de M del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción, y un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de NS del virus de la gripe unido de forma operativa a una secuencia de terminación de la transcripción. El ADNc puede tener orientación sentido o complementaria en relación con el promotor. De este modo, un vector dado a conocer en el presente documento, puede codificar una proteína del ortomixovirus (sentido) o ARNv (complementario). Puede emplearse cualquier promotor para expresar una proteína viral. Los promotores preferidos para los vectores que codifican ARNv incluyen, pero sin limitación, un promotor de la ARN polimerasa I, un promotor de la ARN polimerasa II, un promotor de la ARN polimerasa III, un promotor T7 y un promotor T3. Adicionalmente se prefiere que el promotor de la ARN polimerasa I sea el promotor de la ARN polimerasa I humana. Las secuencias de terminación de la transcripción preferidas para los vectores que codifican el ARNv incluyen, pero no están limitadas a, una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I, una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa II o una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa III o una ribozima. Preferiblemente, los vectores comprenden ADNc de la gripe, por ejemplo, ADN de la gripe A (por ejemplo, cualquier gen de la gripe A que incluye cualquiera de los 15 subtipos de HA o de los 9 subtipos de NA), B o C (véase los Capítulos 45 y 46 de Fields Virology (Fields y col. (editores), Lippincott-Raven Publ. Filadelfia, PA (1996), aunque se prevé que pueden emplearse el/los gen/es de cualquier virus en los vectores o procedimientos de la invención dados a conocer en el presente documento.

La divulgación proporciona una composición que comprende una pluralidad de los vectores de ortomixovirus dados a conocer en el presente documento. En una realización, la composición comprende: a) al menos dos vectores seleccionados de un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de PA del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de PB1 del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de PB2 del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de HA del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de NP del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de NA unido a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de M del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción, y un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de NS del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción; y b) al menos dos vectores seleccionados de un vector que codifica PA del virus de la gripe, un vector que codifica PB1 del virus de la gripe, un vector que codifica PB2 del virus de la gripe y un vector que codifica NP del virus de la gripe. Preferiblemente, los vectores que codifican proteínas virales

comprenden adicionalmente una secuencia de terminación de la transcripción. Se prefiere que un promotor para los vectores que comprenden el ADNc del virus de la gripe, incluya un promotor de la ARN polimerasa I, un promotor de la ARN polimerasa II, un promotor de la ARN polimerasa III, un promotor T7 y un promotor T3. También se prefiere que cada vector que comprende el ADNc del virus de la gripe comprenda una secuencia de terminación de la transcripción, tal como una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I, una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa II o una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa III o una ribozima. Preferiblemente, los vectores comprenden ADN de la gripe, por ejemplo, ADN de la gripe A, B o C.

Más preferiblemente, la composición comprende una pluralidad de vectores del ortomixovirus, que comprenden: a) al menos dos vectores seleccionados de un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa a un ADNc de PA del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I, un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa a un ADNc de PB1 del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I, un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa al ADNc de PB2 del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I, un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa al ADNc de HA del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I, un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa a un ADNc de NP del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I, un vector que comprende el promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa al ADNc de NA unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I, un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa al ADNc de M del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la ARN polimerasa I y un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa al ADNc de NS del virus de la gripe y unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I y b) al menos dos vectores seleccionados de un vector que codifica PA del virus de la gripe, un vector que codifica PB1 del virus de la gripe, un vector que codifica PB2 del virus de la gripe, un vector que codifica NP del virus de la gripe, un vector que codifica HA del virus de la gripe, un vector que codifica NA del virus de la gripe, un vector que codifica M1 del virus de la gripe, un vector que codifica M2 del virus de la gripe y un vector que codifica NS2 del virus de la gripe.

Otra realización dada a conocer en el presente documento comprende una composición como se ha descrito anteriormente, que comprende adicionalmente un vector que comprende un promotor unido a las secuencias no codificantes 5' del ortomixovirus unidas a secuencias deseadas no codificantes 3' del ortomixovirus unidas a secuencias de terminación de la transcripción. La introducción de dicha composición en una célula hospedadora que permite la replicación del ortomixovirus da lugar a un virus recombinante que comprende ARNv que se corresponde con las secuencias del vector que comprende secuencias no codificantes 5' del ortomixovirus unidas a un ADNc unido a secuencias no codificantes 3' del ortomixovirus. Preferiblemente, el ADNc está en una orientación complementaria. También preferiblemente, el promotor es un promotor de la ARN polimerasa I, un promotor de la ARN polimerasa II, un promotor de la ARN polimerasa III, un promotor T7 y un promotor T3. También se prefiere que la secuencia de terminación de la transcripción sea una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I, una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa II o una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa III o una ribozima. Por ejemplo, el ADNc puede codificar un epítipo inmunogénico, tal como un epítipo útil para terapia contra el cáncer o vacuna.

Una pluralidad de los vectores dados a conocer en el presente documento pueden unirse físicamente, o cada vector puede estar presente en un plásmido individual u otro, por ejemplo, vehículo de administración de ácido nucleico lineal.

La divulgación también proporciona un procedimiento para preparar virus de la gripe. El procedimiento comprende poner en contacto una célula con una pluralidad de los vectores de la invención, por ejemplo, secuencial o simultáneamente, empleando, por ejemplo, una composición dada a conocer en el presente documento, en una cantidad eficaz para obtener virus de la gripe infecciosos. La divulgación también incluye aislar virus de una célula que se pone en contacto con la composición. Por tanto, la divulgación también proporciona un virus aislado, así como una célula hospedadora puesta en contacto con la composición o virus aislado dados a conocer en el presente documento.

Como se describe más adelante en el presente documento, los virus de la gripe A se prepararon completamente a partir de ADNc clonados. La aproximación de genética inversa descrita en este documento es muy eficaz y puede usarse para introducir mutaciones en cualquier segmento génico y para desarrollar sistemas de administración de genes basados en el virus de la gripe. Por ejemplo, se transfectaron células de riñón embrionario humano (293T) con ocho plásmidos, que codificaban cada uno un ARN viral del virus A/WSN/33 (H1N1) o A/PR/8/34 (H1N1), flanqueado por el promotor de la ARN polimerasa I humana y el terminador de la ARN polimerasa I de ratón, junto con plásmidos que codificaban la nucleoproteína viral y las polimerasas virales PB2, PB1 y PA. Esta estrategia produce  $>1 \times 10^3$  unidades formadoras de placa (ufp) de virus por ml de sobrenadante a las 48 horas después de la transfección. Dependiendo del virus generado, la adición de plásmidos que expresan todas las proteínas estructurales virales restantes condujo a un aumento sustancial de la producción de virus,  $>3 \times 10^4$  ufp/ml. La genética inversa también se empleó para generar un virus recombinante que contenía el gen PB1 del virus

A/PR/8/34, con todos los otros genes que representan A/WSN/33. Los virus adicionales producidos mediante este procedimiento tenían mutaciones en el gen PA o poseían un epítipo extraño en la cabeza de la proteína neuraminidasa.

5 Además, se puede emplear el mismo enfoque para otros virus para generar virus de ARN con cadena negativa no segmentados (es decir, paramixovirus, rhabdovirus y filovirus) u otros virus de ARN con cadena negativa segmentados, por ejemplo, arenavirus, bunyavirus, por completo a partir ADNc clonado. Adicionalmente, la expresión de ARNc en células en lugar de ARNv puede mejorar la eficacia de la generación del virus.

10 El procedimiento dado a conocer en el presente documento permite una manipulación sencilla de virus de la gripe, por ejemplo, mediante la introducción de mutaciones atenuantes en el genoma viral. Además, debido a que los virus de la gripe inducen una fuerte inmunidad humoral y celular, la divulgación potencia en gran medida estos virus como vectores para vacunas, en particular en vista de la disponibilidad de variantes naturales del virus, que pueden emplearse secuencialmente, permitiendo su uso repetitivo para terapia génica.

15 Por tanto, la divulgación proporciona vectores o plásmidos aislados y purificados que expresan o codifican proteínas del virus de la gripe o expresan o codifican el ARN de la gripe, tanto ARNv natural como recombinante. Por tanto, un vector o plásmido dado a conocer en el presente documento puede comprender un gen o un marco de lectura abierto de interés, por ejemplo, un gen extraño que codifica un péptido o proteína inmunogénica útiles como una vacuna.

20 Preferiblemente, el vector o plásmido que expresa el ARNv de la gripe comprende un promotor, por ejemplo, una ARN polimerasa I, adecuado para la expresión en una célula hospedadora en particular, por ejemplo, células hospedadoras de ave o mamífero, tal como células caninas, felinas, equinas, bovinas, ovinas o de primates, incluyendo células humanas. También preferiblemente, los vectores o plásmidos que comprende ADN útil para preparar el ARNv de la gripe comprende secuencias de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I. Para vectores o plásmidos que contienen un gen o un marco de lectura abierto de interés, se prefiere que el gen o el marco de lectura abierta esté flanqueado por secuencias no codificantes 5' o 3' del virus de la gripe, e incluso más preferiblemente, que el gen o el marco de lectura abierta esté unido de forma operativa a un promotor de la ARN polimerasa I y a la secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I.

25 Como se describe a continuación en el presente documento, las células 293T se transfectaron con plásmidos que codificaban las proteínas estructurales del virus de la gripe A, junto con un plásmido que contenía el gen indicador de la proteína de fluorescencia verde (GFP), flanqueado por un promotor y un terminador de la ARN polimerasa I. La transcripción intracelular de la construcción anterior mediante la ARN polimerasa I generó el ARNv de GFP que se empaquetó en partículas similares al virus de la gripe. Este sistema, que produjo más de  $10^4$  partículas infecciosas por ml de sobrenadante, puede ser útil en estudios de replicación y formación de partículas del virus de la gripe. También puede beneficiar los esfuerzos en la producción de vacunas y en el desarrollo de vectores mejorados para terapia génica mejorados.

35 Por tanto, la divulgación también proporciona una célula hospedadora, cuyo genoma aumenta de forma estable con al menos una molécula de ADN recombinante. La molécula de ADN recombinante incluye al menos uno de los siguientes: una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica HA del virus de la gripe; una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica NA del virus de la gripe; una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica M1 del virus de la gripe; una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica M2 del virus de la gripe; una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *loxP* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unido a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica PA del virus de la gripe; una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unido a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica PB1 del virus de la gripe; una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica PB2 del virus de la gripe o una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unida a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica NP del virus de la gripe.

Preferiblemente, la célula hospedadora se aumenta con una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica HA del virus de la gripe; una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a la región que codifica NA del virus de la gripe; una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica M1 del virus de la gripe; una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica NS2 del virus de la gripe y una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica M2 del virus de la gripe. Preferiblemente, los sitios *lox* son sitios *loxP*.

La divulgación también proporciona un procedimiento para preparar virus de la gripe infecciosos de replicación defectuosa. El procedimiento comprende poner en contacto una célula hospedadora que se aumenta con al menos una molécula de ADN recombinante de la invención, por ejemplo, que codifican HA, NA, M1, M2, NS2, PA, PB1, PB2 o NP, con un virus de la gripe recombinante que comprende: ARNv que comprende un marco de lectura abierto Cre y ARNv que comprenden genes del virus de la gripe no expresados por la célula hospedadora. A continuación, el virus se recupera de la célula hospedadora puesta en contacto. Preferiblemente, el virus recombinante comprende adicionalmente ARNv que comprende un marco de lectura abierto deseado. Alternativamente, la célula hospedadora aumentada se pone en contacto con un vector que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica Cre, y una pluralidad de vectores que comprende cada uno un promotor unido de forma operativa a un ADNc del virus de la gripe que no está presente en la célula hospedadora. A continuación, el virus se recupera.

La divulgación también proporciona una célula hospedadora, cuyo genoma se aumenta con una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unido a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica proteínas de unión a superficie de la célula hospedadora; una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unido a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica proteínas de fusión; una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica M1 del virus de la gripe; una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unido a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica NS2 del virus de la gripe y una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica M2 del virus de la gripe. Preferiblemente, los sitios *lox* son sitios *loxP*.

Otra realización adicional es a una célula hospedadora, cuyo genoma se aumenta con una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica proteínas de fusión y de unión a superficie de la célula hospedadora; una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unido a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica M1 del virus de la gripe; una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica NS2 del virus de la gripe y una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica M2 del virus de la gripe. Preferiblemente, los sitios *lox* son sitios *loxP*.

Las células hospedadoras aumentadas con moléculas de ADN recombinante, como se describe anteriormente en el presente documento, son útiles para preparar virus de la gripe infecciosos de replicación defectuosa. Por ejemplo, una célula hospedadora transformada de forma estable con moléculas de ADN recombinante que codifican HA, NA, M1, M2 y NS2 se pone en contacto con una pluralidad de vectores, es decir, vectores que expresan ARNv que comprenden un marco de lectura abierto Cre, ARNv que comprende PA, ARNv que comprende NP, ARNv que comprende PB1, ARNv que comprende PB2 y, opcionalmente, ARNv que comprende un gen de interés; y vectores que codifican PA, PB1, PB2 y NP.

Los procedimientos para producir virus descritos en el presente documento, que no requieren de infección con virus

auxiliares, son útiles para estudios de mutagénesis viral y para la producción de vacunas (por ejemplo, para el SIDA, gripe, hepatitis B, hepatitis C, rinovirus, filovirus, malaria, herpes y fiebre aftosa) y vectores para terapia génica (por ejemplo, para cáncer, SIDA, deficiencia de adenosina desaminasa, distrofia muscular, deficiencia de omítina transcarbamilasa y tumores del sistema nervioso central).

5 Por tanto, se proporciona un virus para su uso en terapia médica (por ejemplo, para una vacuna o terapia génica). Por ejemplo, la divulgación proporciona un procedimiento para inmunizar a un individuo frente a un patógeno, por ejemplo, una bacteria, un virus, un parásito o frente a un tumor maligno. El procedimiento comprende administrar al individuo una cantidad de al menos un virus aislado de la invención, opcionalmente en combinación con un adyuvante, eficaz para inmunizar al individuo. El virus comprende ARNv que comprende un polipéptido codificado por el patógeno o un polipéptido específico del tumor.

También se da a conocer un procedimiento para aumentar o incrementar la expresión de una proteína endógena en un mamífero que tiene una indicación o enfermedad caracterizada por una disminución de la cantidad o una carencia de la proteína endógena. El procedimiento comprende administrar al mamífero una cantidad de un virus aislado como se da a conocer en el presente documento eficaz para aumentar o incrementar la cantidad de la proteína endógena en el mamífero. Preferiblemente, el mamífero es un humano.

La divulgación también proporciona vectores y procedimientos para la producción recombinante de virus de cadena positiva, por ejemplo, virus de ARN con sentido positivo. Por tanto, la divulgación da a conocer un vector que comprende un segmento de ADN que comprende secuencias de iniciación de la transcripción de la ARN polimerasa I unidas de forma operativa a un segundo segmento de ADN que comprende secuencias de un virus de ARN con sentido positivo, opcionalmente unido de forma operativa a un tercer segmento de ADN que comprende secuencias de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I. También se proporciona un procedimiento para usar el/los vector/es para preparar virus recombinantes. El procedimiento es particularmente útil puesto que se emplea ADN clonado y técnicas de transfección, de modo que se evita el manejo de ARN. Además, la transcripción de la ARN polimerasa I es muy eficaz y tiene una alta fidelidad. Para virus de ARN con sentido positivo cuyo ARN genómico no está protegido (por ejemplo, pestivirus; virus de la hepatitis C y pivornavirus, incluyendo poliovirus, rinovirus, virus de la hepatitis A y virus de la fiebre aftosa), un ADNc que codifica el genoma de longitud completa se introduce en orientación sentido genómico entre las secuencias del promotor y del terminador de la ARN polimerasa I. La transfección del plásmido en células hospedadoras permisivas produce ARN genómico para la replicación del virus. Un número de virus de ARN con sentido positivo contienen ARN genómico protegido (por ejemplo, flavivirus, incluyendo el virus de la fiebre del dengue y varios virus de la encefalitis). Mientras que las transcripciones de la ARN polimerasa I no están protegidas, un ADNc que codifica el genoma de longitud completa del virus de ARN que tiene ARN genómico protegido, se introduce en orientación sentido antígenómico en un vector de transcripción de la ARN polimerasa I. Después de la transfección del plásmido resultante, la ARN polimerasa I celular transcribe un ARN antígenómico (no protegido). Además, la cotransfección con plásmidos de expresión de proteínas para las proteínas necesarias para la replicación da lugar a la replicación del ARN antígenómico, produciendo por tanto ARN genómico y finalmente virus infecciosos.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Representación esquemática de sistemas genéticos inversos establecidos. En el procedimiento (A) de transfección de RNP, las proteínas NP y las polimerasas se ensamblan en las RNP con el uso del ARNv sintetizado *in vitro*. Las células se transfectan con RNP, seguido de la infección con el virus auxiliar. En el procedimiento (B) de la ARN polimerasa I, un plásmido que contiene el promotor de la ARN polimerasa I, un ADNc que codifica el ARNv que se va a rescatar y el terminador de la ARN polimerasa I se transfectan dentro de las células. La transcripción intracelular mediante la ARN polimerasa I produce el ARNv sintético, que se empaqueta dentro de las partículas de la progenie del virus tras la infección con el virus auxiliar. Con ambos procedimientos, los virus transfectantes (es decir, aquellos que contienen ARN derivado del ADNc clonado) se seleccionan entre la población del virus auxiliar.

Figura 2. Representación esquemática de la generación de construcciones de la ARN polimerasa I. Los ADNc derivados del virus de la gripe se amplificaron mediante PCR, se digirieron con *BsmBI* y se clonaron en los sitios *BsmBI* del vector pHH21 (E. Hoffman, Tesis doctoral, Justus, Universidad de Liebig, Giessen, Alemania), que contiene el promotor (P) de la ARN polimerasa I humana y el terminador (T) de la ARN polimerasa I de ratón. El nucleótido de timidina antes del extremo 5' de la secuencia del terminador (\*T) representa el extremo 3' del ARN viral de la gripe. Las secuencias del virus A de la gripe se muestran en negrita.

Figura 3. Procedimiento de genética inversa propuesto para la generación de virus de ARN con sentido negativo segmentado. Los plásmidos que contienen el promotor de la ARN polimerasa I unido a un ADNc para cada uno de los ocho segmentos del ARN vírico y el terminador de la ARN polimerasa I se transfectan en células junto con los plásmidos de expresión de proteínas. Aunque pueden generarse virus infecciosos con plásmidos que expresan PA, PB1, PB2 y NP, la expresión de todas las proteínas estructurales restantes (mostradas entre corchetes) aumenta la eficacia de la producción de virus dependiendo de los virus generados.

Figura 4. Detección del epítipo FLAG en células infectadas con un virus transfectante. La tinción con anticuerpo se usa para identificar el NA en células MDCK infectadas con PR8-WSN-FL79 (A, D) o virus A/WSN/33 de tipo silvestre



(B, E) o en células MDCK falsamente infectadas (C, F). Nueve horas después de la infección, las células se fijaron con paraformaldehído, se trataron con Tritón X-100 y se incubaron con anticuerpos monoclonales anti-FLAG (A-C) o anti-WSN NA (D-F). Una tinción intensa del *Golgi* (rojo) es aparente en las muestras positivas (A, D y E).

5 Figura 5. Recuperación de mutantes PA. El gen PA de cada virus se amplificó mediante PCR-RT con cebadores que producen un fragmento de 1226 pb (posición 677 a 1903 del ARNm, carriles 1, 3 y 5), que a continuación se digirió con la enzima de restricción *Bsp120I* (en la posición 846 del ARNm, carriles 4 a 7) o *PvuII* (en la posición 1284 del ARNm, carriles 2 a 6). La presencia de sitios para *Bsp120I* o *PvuII* en los productos de PCR producía fragmentos de 169 pb y 1057 pb o de 607 pb y 619 pb, respectivamente. PM=marcadores de peso molecular.

Figura 6. Cebadores empleados para amplificar las secuencias del virus de la gripe.

10 Figura 7. El plásmido pPoll-GFP para generar el ARN similar al del virus de la gripe que codifica la proteína GFP. Este plásmido contiene el gen GFP (derivado de pEGFP-N1; Clontech, Palo Alto, CA) en orientación complementaria entre las regiones no codificantes 5' y 3' del segmento 5 del virus A de la gripe, flanqueado por el promotor de la ARN polimerasa I humana y el terminador de la ARN polimerasa I de ratón.

15 Figura 8. Representación esquemática de la estrategia de generación de PSV. Los plásmidos de expresión de proteínas individuales y un plásmido que contiene el promotor de la ARN polimerasa I, un ADNc que codifica el gen indicador GFP y el terminador de la ARN polimerasa I se transfectaron en células 293T. La transcripción intracelular por la ARN polimerasa I produce ARNv de GFP de polaridad negativa, como se indica mediante las letras invertidas. Los sobrenadantes que contenían las PSV se recogieron, se mezclaron con el virus auxiliar de la gripe y se inocularon en células MDCK.

20 Figura 9. Las proteínas PA, PB1, PB2 y NP del virus de la gripe A encapsulan el ARNv de GFP producido por la ARN polimerasa I, lo que lleva a la expresión de la GFP. Las células 293T se transfectaron con plásmidos que expresaban las proteínas PB2, PB1, PA y NP (A) o con todos los plásmidos excepto el que expresaba la proteína NP (B), junto con el plásmido del gen ARN polimerasa I-GFP para la síntesis intracelular del ARNv del gen indicador. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se fijaron y se determinó la expresión de GFP con un microscopio de fluorescencia.

25 Figura 10. Generación de PSV infecciosas de la gripe. Las células 293T se transfectaron con nueve plásmidos, que expresaban cada uno una proteína estructural viral diferente (A), o con ocho plásmidos omitiendo la construcción para NP (B), junto con el plásmido del gen ARN polimerasa I-GFP. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se recogieron los sobrenadantes que contenían VLP, se mezclaron con el virus auxiliar A/WSN/33 y se inocularon en células MDCK. Las células se fijaron 10 horas después de la infección y se determinó la expresión de GFP con un microscopio de fluorescencia.

30 Figura 11. Representación esquemática del uso de la recombinasa Cre para expresar la proteína NS2 del virus de la gripe en una célula, cuyo genoma aumenta con una molécula de ADN recombinante. El genoma de la célula comprende una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor unido a un sitio específico de recombinación (por ejemplo, *loxP*) unido a una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio de recombinación específico en la misma orientación que el primer sitio de recombinación específico unido al gen NS2.

Figura 12. Preparación de virus de la gripe de replicación defectuosa.

## Descripción detallada

### Definiciones

40 Como se usa en este documento, los términos «aislado y/o purificado» se refieren a la preparación, aislamiento y/o purificación *in vitro* de un vector o plásmido dado a conocer en el presente documento, de modo que no se asocia con sustancias *in vivo* o está sustancialmente purificado a partir de sustancias *in vitro*. Como se usa en este documento, las expresiones «ácido nucleico recombinante» o «secuencia o segmento de ADN recombinante» se refieren a un ácido nucleico, por ejemplo, a ADN, que se ha derivado o aislado a partir de una fuente, que

45 posteriormente puede haberse alterado químicamente *in vitro*, de modo que su secuencia no aparezca en la naturaleza, o se corresponde con secuencia que aparecen en la naturaleza pero que no están colocadas en las posiciones en las que se colocarían en el genoma natural. Un ejemplo de ADN «derivado» de una fuente, podría ser una secuencia de ADN que es idéntica a un fragmento útil y que a continuación se sintetiza químicamente en forma esencialmente pura. Un ejemplo de este ADN «aislado» de una fuente podría ser una secuencia de ADN útil que se escinde o retira de dicha fuente mediante medios químicos, por ejemplo, mediante el uso de endonucleasas de

50 restricción, de modo que puede manipularse adicionalmente, por ejemplo, amplificarse, para su uso como se da a conocer en el presente documento, mediante la metodología de ingeniería genética.

Como se usa en el presente documento, «recombinación específica de sitio» pretende incluir los tres acontecimientos siguientes: 1) delección de un segmento de ADN diana flanqueado por sitios o secuencias de

55 recombinación específicas, por ejemplo, sitios *loxP*; 2) inversión de la secuencia de nucleótidos de un segmento de ADN diana flanqueado por sitios o secuencias de recombinación específica de sitio, por ejemplo, sitios *lox*; y 3)

intercambio recíproco de segmentos de ADN diana próximos a los sitios o secuencias de recombinación específica de sitio, por ejemplo, sitios *lox* localizados en moléculas de ADN diferentes. Los sistemas recombinasa específicos de sitio incluyen, pero no están limitados al, sistema *Cre/loxP* del bacteriófago P1 (Patente de EE. UU. n.º 5.658.772).

5 Para remediar la reversibilidad de una reacción de recombinación específica de sitio, puede alterarse la estructura del sistema de recombinación. La secuencia de recombinación específica de sitio puede mutarse de modo que el producto de la reacción de recombinación no se siga reconociendo como un sustrato para la reacción inversa estabilizando, por tanto, el acontecimiento de la integración o escisión. Por ejemplo, para eliminar secuencias no deseadas, los sitios *lox* en la misma orientación se colocan flanqueando las secuencias no deseadas.

10 Otros sitios *lox* incluyen sitios *loxB*, *loxL* y *loxR* que son secuencias de nucleótidos aisladas de *E. coli* (Hoess y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 3398 (1982)). Los sitios *lox* también pueden producirse mediante una diversidad de técnicas sintéticas que son conocidas en la técnica. Por ejemplo, las técnicas sintéticas para producir sitios *lox* se describen en Ito y col., Nuc. Acid Res., 10, 1755 (1982) y Ogilvie y col., Science, 214, 270 (1981).

15 Como se usa en el presente documento, la expresión «sitio *lox*» significa una secuencia de nucleótidos en la que el producto génico del gen *cre* puede catalizar una recombinación específica de sitio. *LoxP* es una secuencia de nucleótidos de 34 pares de bases que puede aislarse a partir del bacteriófago P1 mediante procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Hoess y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 3398 (1982)). *LoxP* está compuesto de dos repeticiones invertidas de 13 pares de bases separadas mediante una región espaciadora de 8 pares de bases.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión «gen *cre*» significa una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico enzimático que lleva a cabo una recombinación de ADN específica de sitio en células eucariotas en sitios *lox*. Un gen *cre* puede aislarse del bacteriófago P1 mediante procedimientos conocidos en la materia (véase Abremaid y col., Cell, 32, 1301-1311 (1983)).

#### Replicación del virus de la gripe

25 El virus de la gripe A posee un genoma de ocho ARN virales (ARNv) con sentido negativo de cadena sencilla que codifica un total de diez proteínas. El ciclo vital del virus de la gripe empieza con la unión de la hemaglutinina (HA) a receptores que contienen ácido siálico en la superficie de la célula hospedadora, seguido de endocitosis mediada por receptor. El bajo pH en los endosomas tardíos desencadena un cambio conformación en la HA exponiendo, por tanto, el extremo N-terminal de la subunidad HA2 (el denominado péptido de fusión). El péptido de fusión inicia la fusión de la membrana del virus y del endosoma, y la proteína de matriz (M1) y los complejos RNP se liberan en el citoplasma. Los RNP están compuestos por las nucleoproteínas (NP), que encapsulan el ARNv, y el complejo de la polimerasa viral, que está formado por las proteínas PA, PB1 y PB2. Las RNP se transportan al núcleo, donde tiene lugar la transcripción y la replicación. El complejo de la ARN polimerasa cataliza tres reacciones diferentes: la síntesis de un ARNm con una caperuza en el extremo 5' y una estructura poli A en el extremo 3', de un ARN complementario (ARNc) de longitud completa, y del ARNv genómico usando el ADNc como molde. Los ARNv, NP y proteínas polimerasa sintetizadas de nuevo se ensamblaban a continuación en RNP, se exportaban desde el núcleo y se transportada a la membrana plasmática, donde se producía la evaginación de las partículas de la progenie del virus. La proteína neuraminidasa (NA) tiene una función tardía importante en la infección eliminando el ácido siálico de los sialiloligosacáridos, liberando de este modo los viriones recién ensamblados a partir de la superficie celular y previniendo la autoagregación de las partículas víricas. Aunque el ensamblaje del virus implica interacciones proteína-proteína y proteína-ARNv, la naturaleza de estas interacciones es en gran parte desconocida.

#### Thogotovirus

Los thogotovirus (THOV) representan un nuevo género en la familia de *Orthomyxoviridae*. Se transmiten por las garrapatas y se han encontrado en animales domésticos, incluyendo camellos, cabras y ganado bovino. Por consiguiente, los THOV se pueden replicar en garrapatas y células de vertebrados. El genoma de THOV comprende seis segmentos de ARN con sentido negativo de cadena sencilla. Las proteínas codificadas por los tres segmentos más largos muestran una homología significativa con las proteínas polimerasa PB2, PB1 y PA del virus de la gripe. El segmento 5' codifica a una proteína relacionada con NP del virus de la gripe. La glucoproteína del THOV, que está codificada por el segmento 4, no es homóloga tanto a HA o NA del virus de la gripe., pero muestra una similitud de secuencia con respecto a la glucoproteína del baculovirus. Se considera que el segmento más pequeño codifica una proteína matriz y no se parece a ninguna de las proteínas del virus de la gripe. Como el virus de la gripe, se requieren tanto los extremos 3' como 5' del ARNv para la actividad del promotor, y esta actividad se localiza en los nucleótidos terminales 14 y 15 de los extremos 3' y 5' del ARNv respectivamente.

La síntesis de ARNm de THOV está iniciada por estructuras de casquete derivadas de la célula hospedadora. No obstante, a diferencia del virus de la gripe, solo las estructuras casquete (sin nucleótidos adicionales) se escinden a partir de ARNm (Albo y col., 1996; Leahy y col., 1997; Weber y col., 1996). Los ensayos de escisión *in vitro* revelan que se requieren tanto los extremos 5' como 3' de ARNv para la actividad endonucleasa (Lethy y col., 1998), pero la adición de un promotor de ARNc modelo no estimula la actividad endonucleasa (Lethy y col., 1998), como se ha

mostrado para el virus de la gripe (Cianci y col., 1995; Hagen y col., 1994). Se ha propuesto una estructura de «gancho» para los THOV (Leahy y col., 1997; Weber y col., 1997), que es similar a la estructura de sacacorchos propuesta para el virus de la gripe (Flick y col., 1996). Esta estructura de «gancho», sin embargo, solo se encuentra en el promotor de ARNv de los THOV. La secuencia del promotor de ARNc no permite la formación de pares de bases entre las posiciones 2 y 9, y entre 3 y 8 en el extremo 5' del ARNc. Las alteraciones en las posiciones 3 u 8 permiten la formación de pares de bases entre estos nucleótidos estimulan la actividad endonucleasa, que es una evidencia fuertemente soportada de la estructura de «gancho» propuesta (Leahy y col., 1998). Además, esta estructura puede ser crucial para la regulación del ciclo vital de THOV; el promotor de ARNv, que forma la estructura de «gancho», puede estimular la actividad endonucleasa de PB2, permitiendo de este modo la transcripción. A diferencia, el promotor de ARNc puede que no forme la estructura de «gancho» y, por tanto, puede que sea incapaz de estimular la actividad endonucleasa, dando como resultado de este modo la replicación.

#### Bunyavirus

La familia *Bunyaviridae* incluye diversos virus que provocan fiebres hemorrágicas y encefálicas en humanos (por ejemplo, la fiebre del valle del Rift, Hantaan, La Crosse y la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo). Los viriones esféricos y envueltos contienen tres segmentos de ARN con sentido negativo de cadena sencilla (revisado en Elliot, 1997). El segmento más largo (L) codifica la proteína de ARN polimerasa viral (proteína L), mientras que el segmento M codifica los dos glucoproteínas virales G1 y G2, y una proteína no estructural (NSm). El segmento más pequeño (S) codifica la proteína nucleocápsida (N) y una segunda proteína no estructural (NSs). La replicación y transcripción del virus tiene lugar en el citoplasma, y los viriones recién ensamblados salen a través de las membranas del aparato de Golgi.

Bridget y Elliot (1996) han introducido un sistema de genética inversa para generar virus Bunyamwera infecciosos por completo a partir de ADN clonados. Siguieron una estrategia descrita en primer lugar por Schnell y col. (1994) para el virus de la rabia: transcripción intracelular de un ADNc que codifica para el ARN con sentido positivo antígenómico (pero no para el ARN con sentido negativo antígenómico) en células que expresan la polimerasa y nucleoproteínas virales. Bridget y Elliot (1996) infectaron células HeLaT4+ con el virus de la vacuna que expresaba polimerasa T7 y transfetaron estas células con plásmidos que expresaban proteínas codificadas por los segmentos S, M y L. A continuación, transfetaron estas células con estos tres plásmidos que codificaban ADNc antígenómicos de longitud completa flanqueados por el promotor de la polimerasa T7 y la ribozima del virus delta de la hepatitis. Para incrementar el número de partículas de bunyavirus relativas al número de partículas del virus de la vacuna, los autores usaron células de mosquito en las que se replica el virus Bunyamwera, pero no el de la vacuna. No solo se puede usar este protocolo para genomanipular bunyavirus, pero también para generar virus reagrupados que no se pueden obtener fácilmente coinfectando células con cepas de bunyavirus diferentes.

Para estudiar los elementos del promotor de bunyavirus y las proteínas virales que se requieren para la transcripción y replicación, Dunn y col. (1995) clonaron el gen CAT en la orientación con sentido negativo entre las regiones no traducidas 5' y 3' del segmento de ARN de S de Bunyamwera. Se transfetaron las células con construcciones que expresaban las proteínas codificadas por los segmentos L y S y, a continuación, se transfetaron con ARN transcrito *in vitro*, lo que dio como resultado en actividad CAT. El segmento S de bunyavirus codifica dos proteínas, N y NSs, en marcos de lectura que se solapan. Para determinar si ambas de estas proteínas se requieren para la transcripción y replicación, se analizaron frente a actividad CAT construcciones que solo expresaban N o NSs. La expresión de la proteína N, junto con la proteína L, dio como resultado actividad CAT, mientras que no se detectó actividad CAT con la expresión de la construcción de NSs. Por tanto, las proteínas L y N son suficientes para la transcripción y replicación de un ARN similar a bunyavirus.

En lo que respecta al virus de la gripe, las secuencias terminales de ARN de bunyavirus son complementarias y altamente conservadas. Por lo tanto, se ha dado por supuesto que estos elementos de secuencia definen el promotor de bunyavirus y son cruciales para la actividad del promotor. La delección de cinco nucleótidos en el extremo 3' del ARN viral reduce drásticamente la expresión de CAT (Dunn y col., 1995). Por el contrario, la adición de dos nucleótidos en el extremo 5', o de 11 o 35 nucleótidos en el extremo 3' no suprime la expresión de CAT (Dunn y col., 1995). Por tanto, igual que el complejo de la ARN polimerasa del virus de la gripe, la proteína polimerasa de bunyavirus aparentemente puede iniciar internamente la transcripción y/o replicación.

La invención se describirá adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

#### Ejemplo 1

##### Materiales y procedimientos

Células y virus. Las células de riñón embrionario humano 293T y las células de riñón canino de Madin-Darby (MDCK) se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero de ternera fetal al 10 % y en medio de Eagle modificado (MEM) que contenía suero de ternera recién nacida al 5 %, respectivamente. Todas las células se mantuvieron a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5 %. Los virus de la gripe A/WSN/33 (H1N1) y A/PR/8/34 (H1N1) se propagaron en huevos de 10 días.

Construcción de plásmidos. Para generar construcciones de la ARN polimerasa I, los ADNc clonados derivados del

ARN viral de A/WSN/33 o A/PR/8/34 se introdujeron entre las secuencias del promotor y el terminador de la ARN polimerasa I. Brevemente, los ADNc clonados se amplificaron por PCR con cebadores que contenían sitios *BsmBI*, se digirieron con *BsmBI* y se clonaron en los sitios *BsmBI* del vector pHH21 que contiene el promotor de la ARN polimerasa I humana y el terminador de la ARN polimerasa I de ratón, separados por sitios *BsmBI* (Figura 2). Los genes PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M y NS de la cepa A/WSN/33 se amplificaron por PCR usando los plásmidos siguientes: pSCWPB2, pGW-PB1 y pSCWPA (todos ellos obtenidos del Dr. Debi Nayak de la Universidad de California, Los Ángeles) y pWH17, pWNP152, pT3WNA15 (Castrucci y col., 1992), pGT3WM y pWNS1, respectivamente. El gen PB1 del virus de la gripe A/PR/8/34 se amplificó usando pcDNA774 (PB1) (Pérez y col., 1998) como molde. Las secuencias de los cebadores aparecen en la Figura 6. Para asegurarse de que los genes no contenían mutaciones no deseadas, los fragmentos derivados de la PCR se secuenciaron en un secuenciador automático (Applied Biosystem Inc., CA, EE.UU.) según el protocolo recomendado por el fabricante. Los ADNc que codifican los genes HA, NP, NA y M1 del virus A/WSN/33 se clonaron como se ha descrito (Huddleston y col., 1982) y se subclonaron en el vector de expresión eucariótico pCAGGS/MCS (controlado por el promotor de la actina  $\beta$  de pollo) (Niwa y col., 1991), dando lugar a pEWSN-HA, pCAGGS-WSN-NPO-14, pCAGGS-WNA15 y pCAGGS-WSN-MI-2/1, respectivamente. Los genes M2 y NS2 del virus A/PR/8/34 se amplificaron mediante PCR y se clonaron en pCAGGS/MCS, produciendo pEP24c y pCA-NS2. Finalmente, pcDNA774(PB1), pcDNA762(PB2) y pcDNA787(PA) se usaron para expresar las proteínas PB2, PB1 y PA bajo el control del promotor del citomegalovirus (Pérez y col., 1998).

Generación de partículas infecciosas de la gripe. Las células 293T ( $1 \times 10^6$ ) se transfectaron con un máximo de 17 plásmidos en cantidades diferentes usando Trans IT LT-1 (Panvera, Madison, Wisconsin) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se mezclaron el ADN y el reactivo de transfección (2  $\mu$ l de Trans IT-LT-1 por  $\mu$ g de ADN), se incubaron a temperatura ambiente durante 45 minutos y se añadieron a las células. Seis horas después, la mezcla de ADN y reactivo de transfección se sustituyó por Opti-MEM (Gibco/BRL, Gaithersburg, Maryland) que contenía albúmina de suero bovino al 0,3 % y suero de ternera fetal al 0,01 %. A tiempos diferentes tras la transfección, se recogieron los virus del sobrenadante y se valoraron en células MDCK. Puesto que no eran necesarios virus auxiliares para este procedimiento, los virus transfectantes recuperados se analizaron sin la purificación de la placa.

Determinación del porcentaje de células transfectadas con plásmidos que producen virus. Veinticuatro horas después de la transfección, las células 293T se dispersaron con EDTA al 0,02 % en células individuales. A continuación, la suspensión celular se diluyó 10 veces y se transfirió sobre capas confluyentes de células MDCK en placas de 24 pocillos. Los virus se detectaron mediante el ensayo de hemaglutinación.

Ensayo de inmunotinción. Nueve horas después de la infección con el virus de la gripe, las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se fijaron con paraformaldehído al 3,7 % (en PBS) durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se trataron con Triton X-100 al 0,1 % y se procesaron como se describe en Neumann y col. (1997).

## Resultados

Generación de virus infecciosos mediante la expresión dirigida por plásmidos de los segmentos del ARN viral, las tres subunidades de la polimerasa y la proteína NP. Aunque la transfección de las células con una mezcla de RNP extraídas de viriones purificados da lugar a partículas del virus de la gripe infecciosas, esta estrategia probablemente no es eficaz cuando se usa con ocho RNP diferentes generadas *in vitro*. Para producir virus de la gripe infecciosos completamente a partir de ADNc, se generaron *in vivo* ocho RNP virales. Por tanto, se prepararon plásmidos que contenían ADNc para los ARN virales de longitud completa del virus A/WSN/33, flanqueados por el promotor de la ARN polimerasa I humana y el terminador de la ARN polimerasa I de ratón. En principio, la transfección de estos ocho plásmidos en células eucariotas debería dar lugar a la síntesis de los ocho ARNv del virus de la gripe. Las proteínas PB2, PB1, PA y NP, generadas por transfección conjunta de los plásmidos de expresión de proteínas, deberían ensamblar a continuación los ARNv en RNPv funcionales que se replican y transcriben formando, en última instancia, virus de la gripe infecciosos (Figura 3). Se transfectaron  $1 \times 10^6$  células 293T con plásmidos de expresión de proteínas (1  $\mu$ g de pcDNA762(PB2), 1  $\mu$ g de pcDNA774(PB1), 0,1  $\mu$ g de pcDNA787(PA) y 1  $\mu$ g de pCAGGS-WSN-NPO/14) y 1  $\mu$ g de cada uno de los siguientes plásmidos de la ARN polimerasa I (pPoll-WSN-PB2, pPoll-WSN-PB1, pPoll-WSN-PA, pPo1I-WSN-HA, pPo1I-WSN-NP, pPoll-WSN-NA, pPoll-WSN-M y pPoll-WSN-NS). La decisión de usar una cantidad reducida de pcDNA787(PA) se basó en observaciones previas (Mena y col., 1996) y en datos de las condiciones óptimas para la generación de partículas similares a virus (PSV) (datos no mostrados). Veinticuatro horas después de la transfección de las células 293T, se encontraron en el sobrenadante  $7 \times 10^3$  ufp del virus por ml (Experimento 1, Tabla 1), lo que demostraba por vez primera la capacidad de los sistemas de genética inversa para producir el virus de la gripe A completamente a partir de plásmidos.

Tabla 1. Conjuntos de plásmidos utilizados para producir el virus de la gripe a partir de ADNc clonado\*

Plásmidos de la ARN polimerasa I para: †		Experimento							
		1	2	3	4	5	6	7	8
	PB1	+	+	-	-	-	-	-	-
	PR8-PB1	-	-	+	+	+	+	+	+
	PB2	+	+	+	+	+	+	+	+
	PA	+	+	+	+	+	+	+	+
	HA	+	+	+	+	+	+	+	+
	NP	+	+	+	+	+	+	+	+
	NA	+	+	+	+	+	+	+	+
	M	+	+	+	+	+	+	+	+
	NS	+	+	+	+	+	+	+	+
Plásmidos para expresión de proteínas para:									
	PB1	+	+	+	+	-	+	+	+
	PB2	+	+	+	+	+	-	+	+
	PA	+	+	+	+	+	+	-	+
	NP	+	+	+	+	+	+	+	-
	HA	-	+	-	+	+	+	+	+
	NA	-	+	-	+	+	+	+	+
	M1	-	+	-	+	+	+	+	+
	M2	-	+	-	+	+	+	+	+
	NS2	-	+	-	+	+	+	+	+
Título de virus (ufp/ml)		7x10 <sup>3</sup>	7x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>3</sup>	3x10 <sup>4</sup>	0	0	0	0

\* Las células 293T se transfectaron con los plásmidos indicados. Veinticuatro horas (Experimentos 1 y 2) o cuarenta y ocho horas (Experimentos 3 a 8) después, se determinó el valor del virus en el sobrenadante sobre células MDCK.

5 † Siempre que no se indique lo contrario, los plásmidos se construyeron con los ADNc representativos de los ARN del virus A/WSN/33.

Eficacia de la producción del virus de la gripe con la expresión conjunta de todas las proteínas estructurales virales. Aunque la expresión de la NP y de las proteínas de la polimerasa virales es suficiente para la generación dirigida por plásmido del virus de la gripe, era posible que pudiera mejora la eficacia. En estudios previos, la expresión de todas las proteínas estructurales del virus de la gripe (PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M1, M2 y NS2) daba lugar a PSV que contenían un ARNv artificial que codificaba el gen indicador de la cloranfenicol acetiltransferasa (Mena y col., 1996). Por tanto, la disponibilidad del complemento completo de las proteínas estructurales, en lugar de solo aquellas necesarias para la replicación y la transcripción del ARN viral, podría mejorar la eficacia de la producción de virus. Con este objetivo, las células 293T se transfectaron con cantidad óptimas de plásmidos de expresión de las proteínas virales (según se consideró mediante la producción de PSV; datos no publicados): 1 µg de pcDNA762(PB2) y pcDNA774(PB1); 0,1 µg de pcDNA787(PA); 1 µg de pEWSN-HA, pCAGGS-WSN-NPO/14 y pCAGGS-WNA15; 2 µg de pCAGGS-WSN-M1-2/1; 0,3 µg de pCA-NS2 y 0,03 µg de pEP24c (para M2) junto con 1 µg de cada plásmido de la ARN polimerasa I (Experimento 2, Tabla 1). Un segundo conjunto de células se transfectó con el mismo conjunto de plásmidos de la ARN polimerasa I, con la excepción del gen PB1, que fue

5 sustituido por pPoll-PR/8/34-PB1 en un esfuerzo por generar un virus recombinante, junto con los plásmidos que expresan solo PA, PB1, PB2 y NP (Experimento 3, Tabla 1) o aquellos que expresan todas las proteínas estructurales del virus de la gripe (Experimento 4, Tabla 1). Los rendimientos del virus WSN no diferían apreciablemente a las 24 horas (Experimentos 1 y 2, Tabla 1) o a las 36 horas (datos no mostrados) posteriores a la transfección. Sin embargo, se encontró un aumento de más de 10 veces en los rendimientos del virus con PR/8/34-PB1 cuando se proporcionaron todas las proteínas estructurales del virus de la gripe (Experimentos 3 y 4, Tabla 1). Los controles negativos, que carecían de uno de los plásmidos para la expresión de las proteínas PA, PB1, PB2 de las proteínas NP, no producían ningún virus (Experimentos 5 a 8, Tabla 1). Por tanto, dependiendo del virus generado, la expresión de todas las proteínas estructurales del virus de la gripe A mejoraba apreciablemente la eficacia del procedimiento de genética inversa.

10 A continuación, se determinaron las cinéticas de producción del virus tras la transfección de las células usando el conjunto de plásmidos utilizado para generar un virus con el gen A/PR/8/34-PB1. En dos de los tres experimentos, el virus se detectó por vez primera 24 horas después de la transfección. El valor medido en este momento,  $>10^3$  ufp/ml, 48 horas después de la transfección había aumentado a  $>10^6$  ufp/ml (Tabla 2). Para estimar el porcentaje de células transfectadas con plásmidos que producían virus, las células 293T se trataron con EDTA (0,02 %) 24 horas después de la transfección para dispersar las células y, a continuación, se realizaron estudios de dilución límite. En este experimento, no se encontraron virus libres en el sobrenadante del cultivo en este punto temporal. Los resultados indicaban que 1 de cada  $10^{3,3}$  células generaban partículas víricas infecciosas.

Tabla 2. Valores cinéticos de la producción de virus tras la transfección de plásmidos a las células 293T\*

Horas después de la transfección del plásmido	Títulos de virus en los sobrenadantes del cultivo (ufp/ml)		
	Experimento		
	1	2	3
6	0	ND	ND
12	0	ND	0
18	0	ND	0
24	0	$2 \times 10^3$	$6 \times 10^3$
30	ND	$5 \times 10^4$	$9 \times 10^4$
36	$6 \times 10^2$	$>1 \times 10^5$	$7 \times 10^5$
42	ND	$>1 \times 10^6$	$5 \times 10^6$
48	$8 \times 10^4$	$>1 \times 10^6$	$1 \times 10^7$

20 \* Las células 293T se transfectaron con ocho plásmidos de la ARN polimerasa I que codificaban los genes del virus A/WSN/33 con la excepción del gen PB1, que deriva del virus A/PR/8/34 y nueve plásmidos de expresión de proteínas según se describe en el texto. A diferentes puntos temporales, se valoraron los virus en el sobrenadante del cultivo en células MDCK. ND = no determinado.

25 Recuperación del virus de la gripe que contiene el epítipo FLAG en la proteína NA. Para verificar que el nuevo sistema de genética inversa permite la introducción de mutaciones en el genoma del virus de la gripe A, se generó un virus que contiene un epítipo FLAG (Castrucci y col., 1992) en la proteína NA. Las células 293T se transfectaron con un plásmido de la ARN polimerasa I (pPoll-WSN-NA/FL79) que contenía un ADNc que codifica tanto la proteína NA como un epítipo FLAG en el fondo de la cabeza de la proteína, junto con la ARN polimerasa I necesaria y los plásmidos de expresión de proteínas. Para confirmar que el virus recuperado (PR8-WSN-FL79) expresaba de hecho la proteína NA-FLAG, se realizaron ensayos de inmunotinción de las células infectadas con los virus PR8-WSN-FL79 o A/WSN/33 de tipo silvestre. Un anticuerpo monoclonal frente al epítipo FLAG detectaba las células infectadas con PR8-WSN-FL79, pero no aquellas infectadas con el virus de tipo silvestre (Figura 4). La recuperación del virus PR8-WSN-FL79 era tan eficaz como la del virus de tipo silvestre sin etiqueta (datos no mostrados). Estos resultados indican que el nuevo sistema de genética inversa nos permite introducir mutaciones en el genoma del virus de la gripe A.

35 Generación de virus de la gripe infecciosos que contienen mutaciones en el gen PA. Para producir virus que posean mutaciones en el gen PA, se introdujeron dos mutaciones silentes que creaban nuevas secuencias de reconocimiento para endonucleasas de restricción (*Bsp120I* en la posición 846 y *PvuII* en la posición 1.284 del ARNm). Previamente, no fue posible modificar este gen mediante sistemas de genética inversa, debido a la falta de

un sistema de selección fiable. Se recuperaron los virus transfectantes, PA-T846C y PA-A1284. Los virus transfectantes recuperados se clonaron biológicamente mediante dos diluciones límites consecutivas. Para verificar que los virus recuperados eran de hecho transfectantes con mutaciones en el gen PA, se obtuvo el ADNc del gen PA mediante PCR con la transcriptasa inversa. Como se muestra en la Figura 5, los virus PA-T846C y PA-A1284C tenían las mutaciones esperadas dentro del gen PA, como se ha demostrado mediante la presencia de los sitios de restricción recién introducidos. La PCR de las mismas muestras y cebadores virales sin la etapa de transcripción inversa no daba lugar a ningún producto (datos no mostrados), lo que indicaba que el ADNc de PA se originaba de hecho a partir del ARNv en lugar del plásmido utilizado para generar el virus. Estos resultados mostraban cómo los virus con genes mutados podían producirse y recuperarse sin el uso de virus auxiliares.

## 10 Análisis

Los sistemas de genética inversa descritos en este documento permiten producir eficazmente el virus de la gripe A completamente a partir de ADNc clonados. Bridgen y Elliott (1996) también usaron la genética inversa para generar un virus Bunyamwera (familia *Bunyaviridae*), pero contenía solo tres segmentos de ARN con sentido negativo y la eficacia de su producción era menor,  $10^2$  ufp/ $10^7$  células. Aunque los rendimientos del virus diferían entre los experimentos, para el virus de la gripe se observaron con consistencia  $>10^3$  ufp/ $10^6$  células, que contenían ocho segmentos. Hay varias explicaciones para la elevada eficacia del sistema de genética inversa descrito anteriormente en este documento. En lugar de las RNP producidas *in vitro* (Luytjes y col., 1989), se generaron RNP *in vivo* mediante la síntesis intracelular de ARNv, usando la ARN polimerasa I, y a través de la expresión dirigida por plásmidos de las proteínas de la polimerasa viral y de NP. También, el uso de las células 293T, que se transfectan fácilmente con plásmidos (Goto y col., 1997), asegura que una población mayor de células recibía todos los plásmidos necesarios para la producción del virus. Además, el gran número de transcritos producidos por la ARN polimerasa I, que está entre las enzimas expresadas más abundantemente en células en crecimiento, probablemente contribuye a la eficacia general del sistema. Estas características conducen a un número correspondientemente abundante de transcripciones del ARNv y a cantidades adecuadas de la proteína viral para la encapsulación del ARNv, la formación de las RNP en el núcleo y la exportación de estos complejos hasta la membrana celular, donde se ensamblan y liberan los nuevos virus.

Los sistemas de genética inversa previamente establecidos (Enami y col., 1990; Neumann y col., 1994; Luytjes y col., 1989; Pleschka y col., 1996) requieren la infección con virus auxiliares y, por tanto, procedimientos de selección que permiten recuperar un número pequeño de transfectantes a partir de un número extenso de virus auxiliares. Estas estrategias se han empleado para generar virus de la gripe que posean uno de los siguientes genes derivados de ADNc. PB2 (Subbarao y col., 1993), HA (Enami y col., 1991; Horimoto y col., 1994), NP (Li y col., 1995), NA (Enami y col., 1990), M (Castrucci y col., 1995; Yasuda y col., 1994) y NS (Enami y col., 1991). La mayoría de los procedimientos de selección, excepto aquellos aplicables a los genes HA y NA, dependen de la temperatura de crecimiento, la restricción de la gama de hospedadores o la sensibilidad al fármaco, limitando de este modo, la utilidad de la genética inversa para el análisis funcional de los productos génicos. Incluso con los genes HA y NA, para los que se dispone de sistemas de selección dirigida por anticuerpo fiables, es difícil producir virus con deficiencias en el crecimiento destacadas. Por el contrario, el sistema de genética inversa nos permite generar transfectantes con mutaciones en cualquier segmento del gen o con graves defectos del crecimiento. Esta ventaja se muestra en la Figura 5, que muestra la recuperación de virus transfectantes con un gen PA mutado. Si se dispone de la tecnología para introducir cualquier mutación viables en el genoma del virus de la gripe A, se permitirá a los investigadores abordar diversos aspectos a largo plazo, tales como la naturaleza de las secuencias reguladores en las regiones no traducidas del genoma viral, la base molecular de la restricción de la gama de hospedadores y la patogenicidad viral.

Aunque se dispone de vacunas de la gripe inactivadas, su eficacia está por debajo de la óptima debido en parte a su limitada capacidad para inducir respuestas IgA locales y de células T citotóxicas. Los ensayos clínicos de vacunas para la gripe con organismos vivos adaptados al frío, actualmente en desarrollo, sugieren que estas vacunas están atenuadas de forma óptima, de modo que no causarán los síntomas de la gripe, aunque seguirán induciendo inmunidad protectora (revisión en Keitel y Piedra, 1998). Sin embargo, los resultados preliminares indican que estas vacunas con virus vivos no serían significativamente más eficaces que las mejores vacunas inactivadas (revisión en Keitel y Piedra, 1998), dejando espacio para mejoras adicionales. Una posibilidad podría ser modificar una vacuna adaptada al frío con el sistema de genética inversa descrito anteriormente. Alternativamente, podría empezarse a partir del raspado usando la genética inversa para producir una cepa del virus de la gripe A «maestra» con mutaciones múltiples atenuantes en los genes que codifican proteínas internas. La aplicación más fascinante del sistema de genética inversa descrita en este documento puede ser la producción rápida de vacunas de virus vivos atenuados en casos de sospecha de pandemias que implican a nuevos subtipos HA o NA del virus de la gripe.

Este nuevo sistema de genética inversa probablemente potenciará el uso de los virus de la gripe como vectores para vacunas. Los virus pueden manipularse genéticamente para que expresen proteínas extrañas o epítopos inmunogénicos además de las proteínas virales de la gripe. Podrían, por ejemplo, generarse virus con proteínas extrañas como un noveno segmento (Enami y col., 1991) y usarlos como vacunas vivas. Los virus de la gripe no solo estimulan potentes respuestas inmunes mediadas por células y humorales, sino que también proporcionan una amplia matriz de proteínas de superficie del virión HA y NA (por ejemplo, 15 subtipos HA y 9 subtipos NA y sus variantes epidémicas), que permiten repetir la inmunización de la misma población diana.

Se han producido PSV de la gripe que poseen un ARNv artificial que codifica un gen indicador expresando las proteínas de la estructura viral y el ARNv con el sistema del virus de la variolovacuna-polimerasa T7 (Mena y col., 1996). Usando métodos de genética inversa, ahora pueden generarse PSV que contienen ARNv que codifican las proteínas necesarias para la transcripción y la replicación del ARNv (es decir, PA, PB1, PB2 y NP) así como ARNv que codifican proteínas de interés. Estas PSV podrían ser útiles como vehículos de administración de genes. Lo más importante, su carencia de genes que codifican proteínas estructurales virales podría asegurar que no se producirán virus infecciosos después de la terapia génica con PSV. Puesto que el genoma del virus de la gripe no está integrado en el cromosoma del hospedador, el sistema PSV podría ser adecuado para la terapia génica en situaciones que requieren solo una transducción de células a corto plazo (por ejemplo, para el tratamiento del cáncer). Al contrario que los vectores de adenovirus (Kovesdi y col., 1997), las PSV de la gripe podrían contener tanto variantes de HA como de NA, permitiendo el tratamiento repetido de las poblaciones diana.

La familia *Orthomyxoviridae* comprende los virus A, B y C de la gripe, así como el recientemente clasificado Thogotovirus. La estrategia para generar virus de la gripe A infecciosos completamente a partir de ADNc clonado descrita en este documento, podría aplicarse a cualquier ortomixovirus y quizás también a otros virus de ARN con sentido negativo segmentado (por ejemplo, bunyavirus, arenavirus). La capacidad para manipular el genoma viral sin limitaciones técnicas tiene implicaciones profundas en el estudio de los ciclos vitales de los virus y su regulación, la función de las proteínas virales y los mecanismos moleculares de patogenicidad viral.

## Ejemplo 2

La expresión de las proteínas del virus de la gripe PB2, PB1, PA y NP conduce a la replicación y transcripción de un ARN viral artificial. Para generar las PSV de la gripe, se empleó el sistema de la ARN polimerasa I para la síntesis intracelular de los ARN del virus de la gripe (Figura 7). En este sistema, un ADNc que codifica un gen indicador en orientación complementaria está flanqueado por las regiones no codificantes de los extremos 5' y 3' de un ARN viral de la gripe. Este casete se inserta entre un promotor y un terminador de la ARN polimerasa I. La transfección de estas construcciones en células eucarióticas lleva a la transcripción del gen indicador mediante la ARN polimerasa I celular generando de este modo, ARN similares al del virus de la gripe (Neumann y col., 1994). Tras la infección con el virus de la gripe, los ARNv artificiales se replican y transcriben mediante el complejo de la polimerasa viral, dando lugar a la expresión del gen indicador.

Para determinar si la expresión de las proteínas PB2, PB1, PA y NP lleva a la expresión del gen indicador codificado por la transcripción derivada de la ARN polimerasa I, se transfectaron en las células de riñón embrionario humano (293T) con plásmidos (1 µg de cada uno) que expresaban la proteína NP del virus A/WSN/33 (H1N1) bajo el control del promotor de la actina β de pollo (pCAGGS-WSN-NPO/14), las proteínas de la polimerasa del virus A/PR/8/34 bajo el control del promotor de citomegalovirus [(pcDNA762(PB2), pcDNA774(PB1) y pcDNA787(PA))] y una construcción del gen indicador con la polimerasa I (pPoll-GFP). Cuarenta y ocho horas después, del 30 % al 40 % de las células expresaban GFP (Figura 9). Por el contrario, la expresión de GFP no podía detectarse en las células transfectadas que carecían de la polimerasa o de proteínas NP. Estos resultados indicaban que NP y las tres proteínas de la polimerasa viral de la gripe habían formado un complejo funcional que se replicaba y transcribía el ARNv de la GFP derivado de la ARN polimerasa I.

Transcripción y replicación óptimas del ARNv. Para determinar las cantidades de ADN plasmídico necesarias para la expresión óptima de la GFP indicadora, modulamos la expresión de las proteínas de la polimerasa y de NP. Los estudios previos habían indicado que cantidades mayores de PA reducían el grado de expresión del gen indicador en los sistemas de transcripción o replicación (Mena y col., 1996). Por tanto, por etapas, se redujo la expresión de PA a partir del plásmido, identificándose 0,1 µg de pcDNA787(PA) como la cantidad de molde que produce la expresión más potente de la GFP. Con NP, el principal componente estructural de los complejos RNP, pueden ser necesarias grandes cantidad de plásmido de expresión de proteínas. Sin embargo, cantidades mayores del plásmido no afectaban apreciablemente al número de células 293T GFP positivas. Además, diversas cantidades de los plásmidos de expresión de las proteínas PB2 y PB1 (oscilando de 1,0 a 0,03 µg) no afectaban a la expresión de GFP en las células 293T. Por tanto, en todos los experimentos posteriores, se usaron 0,1 µg de pcDNA787(PA) y 1,0 µg de pcDNA 774(PB1), pcDNA762(PB2) y pCAGGS-WSN-NPO/14.

Formación de PSV de la gripe a partir de ADNc clonados. Estudios previos con el sistema de la ARN polimerasa T7 del virus de la variolovacuna mostraban que la formación de las PSV de la gripe necesitaba nueve proteínas del virus de la gripe: PB2, PB1, PA, HA, NA, NP, M1, M2 y NS2 (Mena y col., 1996). La proteína NS1, por el contrario, es dispensable para la formación de la partícula (Mena y col., 1996). Para establecer un sistema dirigido por plásmido eficaz para la generación de PSV, se generaron los ADNc que codificaban los genes HA, NA, M1, M2 y NS2. Los ADNc se clonaron en el vector de expresión eucariota pCAGGS/MCS (controlado por el promotor de la β-actina de pollo), dando lugar a pEWSN-HA, pCAGGS-WNA15, pCAGGS-WSN-M1-2/1, pEP24c y pCA-NS2, respectivamente. La expresión de cada proteína se confirmó mediante análisis por inmunotransferencia.

Para generar PSV, se transfectaron 10<sup>6</sup> células 293T con 1,0 µg de cada plásmido de expresión de proteínas (con la excepción de pcDNA787 (PA), para el que se emplearon 0,1 µg) y con 1 µg de la construcción del gen indicador pPoll-GFP. Los sobrenadantes de los cultivos se recogieron 48 horas después de la transfección y se mezclaron con el virus A/WSN/33 para proporcionar las proteínas del virus de la gripe necesarias para la replicación y la



transcripción del ARNv GFP. A continuación, la mezcla se inoculó en células MDCK. Después de 10 horas de incubación, se detectaron las células MDCK GFP positivas, que se correspondía con 450 partículas/ml de sobrenadante (Tabla 3). Por tanto, la expresión dirigida por plásmidos de todas las proteínas estructurales del virus de la gripe daba lugar a la formación de PSV de la gripe infecciosa que contenía ARNv GFP. Además, el ARNv GFP se suministró a células MDCK.

Ensamblaje óptimo del virus de la gripe. La formación de PSV también se estudió en células que expresaban cantidades diferentes de la construcción del gen indicador con la ARN polimerasa I, así como los ADN plasmídicos de HA, NA, M1, M2 y NS2. En experimentos con pPoll-GFP, 1,0 µg del ADN plasmídico eran muy eficaces para la generación de PSV, mientras que la eficacia se reducía significativamente con 2,0 µg o 3,0 µg. Debido a que las proteínas NS2 y M2 se expresaban en pequeñas cantidades en la fase tardía de la infección, probablemente serían necesarias cantidades relativamente pequeñas de los plásmidos de expresión para la formación óptima de PSV. La reducción de la cantidad de la construcción de expresión de M2 de 1,0 µg a 0,3 µg daba lugar a un aumento en más de diez veces del número de células MDCK GFP positivas (Tabla 3). Una reducción adicional del plásmido a 0,03 µg no aumentaba el número de PSV. Para NS2, cantidades menores de plásmidos ensayados (0,1 µg) se asociaron con una formación menos eficaz de PSV (Tabla 3).

La proteína M1 es el componente estructural principal del virión. Por tanto, probablemente son necesarios niveles elevados de expresión de M1 para la formación eficaz de PSV. Esta predicción se ensayó en experimentos que comparaban la formación de PSV en células transfectadas con 1,0 µg o 2,0 µg del ADN plasmídico de M1. Como se muestra en la Tabla 3, cantidades más elevadas de plásmido daban lugar a un aumento mayor de diez veces en el número de células MDCK GFP positivas. La comparación de dos cantidades diferentes (1 µg frente a 2 µg) de plásmidos que expresaban las proteínas HA y NA no revelaban ninguna diferencia apreciable en la formación de PSV, llevando a la selección de 1 µg de cada plásmido (pEWSH-HA, pCAGGS-WNA15) para su uso en experimentos posteriores. En general, estos estudios dan lugar a un aumento de >100 veces en la eficacia de la formación de PSV, llevando finalmente a la producción de más de  $10^4$  partículas infecciosas del virus de la gripe por ml de sobrenadante (Figura 10).

Tabla 3. Cantidades óptimas de ADN plasmídicos para la formación de PSV\* infecciosas.

PB2	Cantidad (µg) de ADN plasmídico que expresan:										Eficacia relativa de la formación de PSV†
	PB1	PA	HA	NP	NA	M1	M2	NS2	ARNv GFP		
1,0	1,0	0,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1
1,0	1,0	0,1	1,0	1,0	1,0	1,0	0,1	1,0	1,0	1,0	28
1,0	1,0	0,1	1,0	1,0	1,0	1,0	0,03	1,0	1,0	1,0	17
1,0	1,0	0,1	1,0	1,0	1,0	1,0	0,1	1,0	1,0	1,0	28
1,0	1,0	0,1	1,0	1,0	1,0	1,0	0,1	0,3	1,0	1,0	24
1,0	1,0	0,1	1,0	1,0	1,0	1,0	0,1	0,1	1,0	1,0	11
1,0	1,0	0,1	1,0	1,0	1,0	1,0	0,1	1,0	1,0	1,0	28
1,0	1,0	0,1	1,0	1,0	1,0	2,0	0,1	1,0	1,0	1,0	220

\* Las células 293T se transfectaron con plásmidos de expresión para las nueve proteínas estructurales del virus de la gripe y con el plásmido del gen ARN polimerasa I-GFP. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se recogieron los sobrenadantes que contenían PSV, se mezclaron con el virus auxiliar AWSN/33 y se inocularon en células MDCK. Después de 10 h de infección, las células se fijaron y se determinó la expresión de GFP con un microscopio de fluorescencia. Solo variaron las cantidades de los plásmidos M1, M2 y NS2 (letra en negrita) para determinar las cantidades óptimas para la expresión de GFP en células MDCK.

†La eficacia relativa de la formación de PSV se determinó mediante el recuento del número de células GFP positivas en cinco campos del microscopio. Se eligió como referencia (valor de 1) la muestra de cada plásmido que contenía 1 µg (que producía 450 PSV infecciosas/ml de sobrenadante).

- Autenticidad de las PSV producidas completamente a partir de plásmidos. Para verificar que las PSV inician la infección del mismo modo que los virus de la gripe auténticos, las PSV se neutralizaron con el anticuerpo frente al WSN HA. Los sobrenadantes que contenían PSV derivadas de células 293T transfectadas con plásmidos se incubaron con una mezcla de anticuerpos monoclonales anti-WSN HA y con un anticuerpo monoclonal frente a la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV) (control negativo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadió a la mezcla el virus auxiliar A/PR/8/34, que no se neutraliza con la mezcla de anticuerpos monoclonales anti-WSN HA, y se inoculó dentro de células MDCK. Solo el anticuerpo monoclonal específico anti-WSN HA neutralizaba las PSV, lo que indicaba que la HA mediaba la unión y la entrada dentro de las células de las PSV.
- 5
- 10 A continuación, se identificó el conjunto mínimo de proteínas necesario para la formación de PSV. Otros autores habían establecido que las tres polimerasas del virus de la gripe y la NP son esenciales para la replicación y transcripción del ARNv (Honda y col., 1988). Por tanto, se incluyeron cada una de estas cuatro proteínas, aunque se omitieron consecutivamente HA, NA, M1, M2 o NS2. La exclusión de ninguno de estos plásmidos afectaba a la replicación o transcripción del ARNv GFP en células 293T transfectadas. Los sobrenadantes derivados de células 15 293T transfectadas que carecían de las proteínas HA, NA, M1 o NS2 no promovían la expresión de GFP en las células MDCK infectadas, lo que indicaba la ausencia de PSV infecciosas. Se detectaron las PSV infecciosas con la omisión de M2 pero el número era menor (reducción de >500 veces en comparación con el conjunto completo de proteínas estructurales). Por tanto, según los datos de los estudios del sistema del virus de la gripe son necesarias todas las proteínas estructurales del virus de la gripe para la formación eficaz de PSV infecciosas (Mena y col., 20 1996).
- Las glucoproteínas del VSV pueden sustituir a las proteínas HA y NA en la producción de las PSV. Las proteínas HA y NA del virus de la gripe se sustituyeron por la proteína G del VSV, que tiene funciones de unión al receptor y de fusión. En las células 293T transfectadas con pPoll-GFP; cantidades óptimas de las construcciones de expresión de PB2, PB1, PA, NP, M1, M2 y NS2; y 1 µg de la construcción VSV-G (pCAGGS-VSV-G), sustitución de la proteína 25 VSV-G por las glucoproteínas del virus de la gripe, no afectaban de forma adversa a la formación de PSV. Por el contrario, se encontraron cantidades mayores de células GFP-positivas de forma reproducible cuando se utilizó VSV-G, en lugar de las HA y NA, como glucoproteína viral. Por tanto, la proteína VSV G puede incorporarse de forma eficaz a los viriones de la gripe y puede funcionar del mismo modo que HA o NA en la liberación y entrada del virus.
- 30 Un sistema eficaz de generación de partículas infecciosas del virus de la gripe podría ser una ventaja para la investigación con este virus y, posiblemente, para la producción de vacunas y vectores dirigidos a terapia génica. Al contrario que el sistema del virus de la variolovacuna existente, la estrategia de producción de PSV descrita en este documento es muy eficaz, tanto en la transfección inicial de células como en el rendimiento de PSV (>10<sup>4</sup> partículas 35 infecciosas/ml de sobrenadante). Además, está dirigido completamente por plásmidos que expresan proteínas del virus de la gripe (es decir, en ausencia de cualquier otra proteína viral), lo que simplificaba muchísimo la interpretación de resultados. Otra ventaja principal es la capacidad para estudiar los efectos de mutaciones letales sobre la formación de viriones, el empaquetamiento de los complejos RNP. La evaginación de la replicación del virus y los procesos de unión y de fusión. Además, es probable que el sistema descrito en este documento pueda funcionar igualmente bien con otro virus, por ejemplo, paramixovirus o rhabdovirus.
- 40 Las proteínas HA y NA del virus de la gripe pueden sustituirse funcionalmente por la glicoproteína G del VSV. Previamente, se había publicado que el virus de la gripe no podía incorporar la proteína G del VSV cuando se proporcionaba mediante un virus SV40 recombinante (Naim y col., 1993). Los resultados descritos en este documento sugieren que ni HA ni NA son esenciales para la formación de PSV, aunque no puede descartarse que estas glucoproteínas puedan participar en las interacciones con otras proteínas virales, afectando así a la estructura 45 de los viriones, según sugieren las formas alargadas de los virus que expresan HA o NA sin cola, o ambas (García-Sastre y col., 1995; Jin y col., 1994; Jin y col., 1997; Mitnaul y col., 1996).
- Los sistemas basados en plásmidos descritos en este documento pueden utilizarse especialmente para la administración de genes terapéuticos. Pueden prepararse PSV que contienen el ARNv que codifica las proteínas necesarias para la transcripción y replicación (es decir, la NP y las polimerasas), así como un ARNv que codifica la 50 proteína de interés. Estas partículas son infecciosas y pueden llevar un gen designado dentro de células diana, donde podría replicarse y ser transcrito. Debido a que estas partículas no contienen un complemento completo de los genes virales, no pueden producir una progenie de virus infecciosos. Esta característica, junto con la carencia de integración del genoma vírico en los cromosomas del hospedador, podría garantizar la seguridad biológica del gen administrado en sujetos humanos o no humanos. Finalmente, la disponibilidad de 15 subtipos HA y 9 subtipos de NA 55 y sus variantes podrían permitir la administración repetida de PSV, superando de este modo la inmunorresistencia a las proteínas generadas por vectores, uno de los obstáculos principales afrontados con el uso repetido de otros vectores virales, tales como adenovirus. Un beneficio adicional del sistema dirigido por plásmidos podría ser realizar sustituciones que requieran solo expresión a corto plazo de proteínas extrañas, como en el tratamiento del cáncer.

**Ejemplo 3**

Usando el sistema *Cre-loxP*, pueden generarse líneas celulares empaquetadoras para la producción de virus de replicación defectuosa. Por ejemplo, se prepara un vector de expresión de proteína que contienen un casete de parada de la transcripción (por ejemplo, pBS302 de Life Technologies, Bethesda, Maryland; y Sauer y col., 1993; Lasko y col., 1992; Pichel y col., 1993; Bolivar y col., 1977; Stuhl y col., 1981; Stuhl, 1985; Fiers y col., 1978), flanqueado por dos sitios *loxP* y uno de los genes virales. La transcripción iniciada en la secuencia promotora, se bloquea en los sitios de parada de la transcripción. Por tanto, el gen viral no se transcribe ni traduce. Una célula que está transfectada de forma estable con este vector, se infecta con un virus de la gripe carente del ARNv que codifica el gen clonado dentro del sistema *loxP*. Este virus también contiene un ARNv adicional que codifica la proteína Cre. Este virus no es viable en células normales debido a que carece de uno de sus ARNv. Sin embargo, en la línea celular empaquetadora, la proteína Cre que se expresa a partir del ARNv induce una recombinación en el sitio *loxP*, dando lugar a la delección del sitio de parada de la transcripción. De este modo, ahora se transcriben y expresan los genes virales respectivos, permitiendo que el virus se amplifique en estas células (Figura 11).

Además, se preparan líneas celulares empaquetadoras que expresan las proteínas virales tardías (es decir, HA, NA, M1, M2 y NS2) controladas por el sistema *loxP* (Figura 12). Las proteínas HA y NA pueden sustituirse por otras proteínas virales de unión al receptor y de fusión (por ejemplo, Ebola GP, Marburg GP, glucoproteínas GP1 y GP2 de bunyavirus, las proteínas G y/o F de rhabdovirus y paramixovirus, glucoproteínas de thogotovirus y las glucoproteínas de los virus de ARN con cadena positiva). Se generan partículas similares a virus que contienen los ARNv que codifican las proteínas necesarias para la replicación o transcripción (es decir, las proteínas polimerasas y NP), un ARNv que codifica el gen de interés y un ARNv que codifica Cre. Estos ARNv se empaquetan en partículas similares a virus en las líneas celulares empaquetadoras.

Estas partículas similares a virus pueden usarse con fines de vacunación y terapia génica ya que (i) no contienen el complemento completo de los genes virales y, por tanto, no pueden formar partículas de progenie infecciosas, cumpliendo con los aspectos estrictos sobre seguridad; (ii) probablemente expresarán la proteína extraña a niveles elevados; (iii) no expresan las glucoproteínas virales (HA, NA) que son los antígenos principales; por tanto, la respuesta inmune del hospedador frente a las proteínas virales debe ser limitada.

Referencias

Albo, C., Martin, J. y Portela, A. J. *Virol.*, 70, 9013-9017 (1996).

Baron, M. D. y Barrett, T. J. *Virol*, 71, 1265-1271 (1997).

Bolivar y col. *Gene*, 2, 95 (1977).

Bridgen, A. y Elliott, R. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, 15400-15404 (1996).

Castrucci, M. R. y Kawaoka, Y. J. *Virol*, 69, 2725-2728 (1995).

Castrucci, M. R., Bilsel, P. y Kawaoka, Y. J. *Virol.*, 66, 4647-4653 (1992).

Collins, P. L., Hill, M. G., Camargo, E., Grosfeld, H., Chanock, R. M. y Murphy, B. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92, 11563-11567 (1995).

Cozelmann, K. K. y Schnell, M. J. *Virol*, 68, 713-719 (1994).

Dunn, E. F., Pritlove, D. C., Jin, H. y Elliott, R. M. *Virology*, 211, 133-143 (1995).

Elliott, R. M. *Mol. Med.*, 3, 572-577 (1997).

Enami, M., Sharma, G., Benham, C. y Palese, P. *Virology*, 185, 291-298 (1991).

Enami, M. y Palese, P. J. *Virol*, 65, 2711-2713 (1991).

Enami, M., Luytjes, W., Krystal, M. y Palese, P. *Proc. Natl Acad. Sci, U.S.A.*, 87, 3802-3805 (1990).

Fiers y col. *Nature*, 273, 113 (1978).

Garcia-Sastre, A. y P. Palese. *Virus Res.*, 37, 37-47 (1995).

Garcin, D., Pelet, T., Calain, P., Roux, L., Curran, J. y Kolakofsky, D. *EMBO J.*, 14, 6087-6094 (1995).

Goto, H., Bethell, R. C. y Kawaoka, Y. *Virology*, 238, 265-272 (1997).

Hagen, M., Chung, T. D. Y., Butcher, J. A. y Krystal, M. J. *Virol.*, 68, 1509-1515 (1994).

He, B., Paterson, R. G., Ward, C. D. y Lamb, R. A. *Virology*, 237, 249-260 (1997).

- Hoffman, M. A. y Banerjee, A. K. *J. Virol.*, 71, 4272-4277 (1997).
- Honda, A., K. Ueda, K. Nagata y A. Ishihama., *J. Biochem. (Tokio)*, 104, 1021-1026 (1988).
- Horimoto, T. y Kawaoka, Y. *J. Virol.*, 68, 3120-3128 (1994).
- Huddleston, J. A. y Brownless, G. G. *Nucl. Acids Res.*, 10, 1029-1037 (1982).
- 5 Jin, H., G. P. Leser y R. A. Lamb. *EMBO J.*, 13, 5504-5515 (1994).
- Jin, H., G. P. Leser, J. Zhang y R. A. Lamb. *EMBO J.*, 16, 1236-1247 (1997).
- Kato, A., Sakai, Y., Shioda, T., Kondo, T., Nakanishi, M. y Nagai, Y. *Genes Cells*, 1, 569-579 (1996).
- Keitel, W. A. y Piedra, P. A. en *Textbook of Influenza*, editores. Nickolson, K. G., Webster, R. G. y Hay, A. (Blackwell, Oxford), pág. 373-390 (1998).
- 10 Kovesdi, I., Brough, D. E., Bruder, J. T. y Wickham, T. J. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8, 583-589 (1997).
- Lasko y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 6232 (1992).
- Lawson, N. D., Stillman, E. A., Whitt, M. A. y Rose, J. K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92, 4477-4481 (1995).
- Leahy, M. B., Dessens, J. T. y Nuttall, P.A. *J. Virol.*, 71, 8347-8351 (1997).
- Leahy, M. B., Dessens, J. T. y Nuttall, P. A. *J. Virol.*, 71, 8352-8356 (1997).
- 15 Leahy, M. B., Dessens, J. T., Pritlove, D. C. y Nuttall, P.A. *J. Virol.*, 72, 2305-2309 (1998).
- Li, S., Xu, M. y Coelingh, K. *Virus Res.*, 37, 153-161 (1995).
- Luytjes, W., Krystal, M., Enami, M., Parvin, J. D. y Palese, P. *Cell*, 59, 1107-1113 (1989).
- Mena, I., Vivo, A., Pérez, E. y Portela, A. *J. Virol.*, 70, 5016-5024 (1996).
- Naim, H.Y. y M.G. Roth. *J. Virol.*, 67, 4831-4841 (1993).
- 20 Neumann, G., Castrucci, M. R. y Kawaoka, Y. *J. Virol.*, 71, 9690-9700 (1997).
- Neumann, G., Zobel, A. y Hobom, G. *Virology.*, 202, 477-479 (1994).
- Niwa, H., Yamamura, K. y Miyazaki, J. *Gene*, 108, 193-200 (1991).
- Palese, P., Zheng, H., Engelhardt, O. G., Pleschka, S. y Garcia-Sastre, A. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 93, 11354-11358 (1996).
- 25 Perez, D. R. y Donis, R. O. *Virology*, 249, 52-61 (1998).
- Pichel y col. *Oncogene*, 8, 3333 (1993).
- Pleschka, S., Jaskunas, S. R., Engelhardt, O. G., Zürcher, T., Palese, P. y García-Sastre, A. *J. Virol.*, 70, 4188-4192 (1996).
- Radecke, F., Spielhofer, P., Schneider, H., Kaelin, K., Huber, M., Dotsch, C., Christiansen, G. y Gilletter, M. A. *EMBO J.*, 14, 5773-5784 (1995).
- 30 Schnell, M.J., Mebatsion, T. y Conzelmann, K.K. *EMBO J.*, 13, 4195-4203 (1994).
- Struhl, K. *NAR.*, 13, 8587 (1985).
- Struhl, K. y col. *J. Mol. Biol.*, 152, 553 (1985).
- Suárez, P. et al. *J. Virol.*, 66, 2491 (1992).
- 35 Subbarao, E. K., Kawaoka, Y. y Murphy, B. R. *J. Virol.*, 62, 7223-7228 (1993).
- Weber, F., Haller, O. y Kochs, G. *J. Virol*, 70, 8361-8367 (1996).
- Weber, F., Haller, O. y Kochs, G. *Arch. Virol.*, 142, 1029-1033 (1997).
- Whelan, S. P., Ball, L. A., Barr, J. N. y Wertz, G. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92, 8388-8392 (1995).



- polimerasa I unido de forma operativa al ADNc de NS del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica PA del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica PB1 del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica PB2 del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica NP del virus de la gripe, y un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido a las secuencias no codificantes 5' del virus de la gripe unidas al ADNc de interés o fragmento del mismo en orientación complementaria unido a secuencias no codificantes 3' del virus de la gripe unidas a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I.
- 5
- 10 4. Una composición que comprende una pluralidad de vectores del ortomixovirus, que comprende:
- un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa a un ADNc de PA del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I, un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa a un ADNc de PB1 del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I, un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa al ADNc de PB2 del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I, un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa al ADNc de HA del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I, un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa a un ADNc de NP del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I, un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa al ADNc de NA unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I, un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa al ADNc de M del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la ARN polimerasa I, un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa al ADNc de NS del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica PA del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica PB1 del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica PB2 del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica NP del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica HA del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica NA del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica M1 del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica M2 del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica NS2 del virus de la gripe y un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido a las secuencias no codificantes 5' del virus de la gripe unidas al ADNc de interés o fragmento del mismo en orientación complementaria unido a secuencias no codificantes 3' del virus de la gripe unidas a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I.
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40 5. La composición del punto 1 o 2 en la que los vectores de a) están unidos.
6. La composición del punto 1 o 2 en la que los vectores de b) están unidos.
7. La composición del punto 1 o 2 en la que cada vector de a) está en un plásmido separado.
8. La composición del punto 1 o 2 en la que cada vector de b) está en un plásmido separado
9. La composición del punto 1 o 2 en la que el promotor de los vectores de a) comprenden un promotor de la ARN polimerasa I, promotor de la ARN polimerasa II, promotor de la ARN polimerasa III, promotor T7 o promotor T3.
- 45 10. La composición del punto 9 en la que el promotor de la ARN polimerasa I es un promotor de la ARN polimerasa I humana.
11. La composición de la reivindicación 1 o 2 en la que cada uno de los vectores de b) comprende adicionalmente una secuencia de terminación de transcripción de ARN.
12. La composición del punto 1 o 2 en la que la secuencia de terminación de transcripción de vectores de a) comprende una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I, secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa II, secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa III o una ribozima.
- 50 13. La composición del punto 1 o 2 que comprende adicionalmente un vector que comprende un promotor unido a secuencias no codificantes 5' del virus de la gripe unidas al ADNc unido a secuencias no codificantes 3' del virus de la gripe unidas a una secuencia de terminación de la transcripción.
- 55 14. La composición del punto 1, 2, 3, o 4, en la que uno cualquiera de los ADNc está en la orientación sentido.

15. La composición del punto 1, 2, 3, o 4, en la que uno cualquiera de los ADNc está en la orientación complementaria.
16. Un procedimiento para preparar virus de la gripe, que comprende: poner en contacto una célula con la composición del punto 1, 2, 3 o 4 en una cantidad eficaz para producir virus de la gripe infecciosos.
- 5 17. El procedimiento del punto 16 que comprende adicionalmente aislar el virus.
18. Virus obtenido mediante el procedimiento del punto 16.
19. Una composición que comprende una pluralidad de vectores del ortomixovirus, que comprende:
- un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa a un ADNc de PA del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I, un vector que
- 10 comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa a un ADNc de PB1 del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I, un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa al ADNc de PB2 del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I, un vector que comprende un promotor de la
- 15 ARN polimerasa I unido de forma operativa a un ADNc de NP del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica PA del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica PB1 del virus de la gripe, un vector que comprende un
- 20 promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica PB2 del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica NP del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica HA del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica NA del
- 25 virus de la gripe, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica M1 del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica M2 del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica NS2 del virus de la gripe y un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido a las secuencias no codificantes 5' del virus de la gripe unidas al ADNc complementario unido a secuencias no codificantes 3' del virus de la gripe unidas a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I.
20. Un procedimiento para preparar un vehículo de administración de genes, que comprende: poner en contacto
- 30 células con la composición del punto 19 en una cantidad eficaz para producir virus de la gripe, y aislar el virus.
21. Virus obtenido mediante el procedimiento del punto 20.
22. Una célula puesta en contacto con la composición del punto 1, 2, 3, 4 o 19.
23. Una célula infectada con el virus del punto 18.
24. Una célula infectada con el virus del punto 21.
- 35 25. Un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa a un ADNc de PA del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I.
26. Un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa a un ADNc de PB1 del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I.
- 40 27. Un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa al ADNc de PB2 del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I.
28. Un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa a un ADNc de NP del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I.
29. Un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa a un ADNc de HA del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I.
- 45 30. Un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa a un ADNc de NA del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I.
31. Un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa a un ADNc de M1 del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I.
- 50 32. Un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa a un ADNc de M2 del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I.



33. Un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa a un ADNc de NS2 del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I.
34. Un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa a un ADNc de M del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I.
- 5 35. Un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa a un ADNc de NS del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I.
36. Una célula hospedadora, cuyo genoma se aumenta de forma estable con al menos uno de los siguientes:
- una molécula de ADN recombinante, que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica HA del virus de la gripe;
- 10 una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica NA del virus de la gripe;
- una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unida a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codificaba M1 del virus de la gripe;
- 15 una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica NS2 del virus de la gripe;
- una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unido a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica M2 del virus de la gripe;
- 20 una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unido a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica PA del virus de la gripe;
- una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unido a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica PB1 del virus de la gripe;
- 25 una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica PB2 del virus de la gripe; o
- una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unida a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica NP del virus de la gripe.
- 35 37. La célula hospedadora del punto 36 que se aumenta con una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica HA del virus de la gripe; una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a la región que codifica NA del virus de la gripe; una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada unida a un segundo sitio *lox* unido a la región que codifica M1 del virus de la gripe; una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica NS2 del virus de la gripe y una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica M2 del virus de la gripe.
- 40
- 45
38. La célula hospedadora del punto 36, en la que se aumenta la célula hospedadora con una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica NS2 del virus de la gripe.
- 50
39. La célula hospedadora del punto 36, 37 o 38 en la que los sitios *lox* son sitios *loxP*.

40. Un procedimiento para preparar virus de la gripe infecciosos de replicación defectuosa, que comprende:
- i) poner en contacto la célula hospedadora del punto 36 o 37 con un virus de la gripe recombinante que comprende: ARNv que comprende un marco de lectura abierto Cre y ARNv que comprende genes de la gripe no presentes en el genoma de la célula hospedadora; y
- 5 ii) recuperar el virus de la célula hospedadora.
41. Un procedimiento para preparar virus de la gripe infecciosos de replicación defectuosa, que comprende:
- i) poner en contacto la célula hospedadora del punto 38 con un virus de la gripe recombinante que comprende: ARNv que comprende un marco de lectura abierto Cre, ARNv que comprende PA, ARNv que comprende PB1, ARNv que comprende PB2, ARNv que comprende NP, ARNv que comprende HA, ARNv que comprende NA, ARNv que comprende M1, y ARNv que comprende M2; y
- 10 ii) ) recuperar el virus de la célula hospedadora.
42. Un procedimiento para preparar virus de la gripe infecciosos de replicación defectuosa, que comprende:
- i) poner en contacto la célula hospedadora del punto 38 con un virus de la gripe recombinante que comprende: ARNv que comprende un marco de lectura abierto Cre, ARNv que comprende PA, ARNv que comprende PB1, ARNv que comprende PB2, ARNv que comprende NP, ARNv que comprende HA, ARNv que comprende NA, y ARNv que comprende M; y
- 15 ii) recuperar el virus de la célula hospedadora.
43. Un procedimiento para preparar virus de la gripe infecciosos de replicación defectuosa, que comprende:
- i) poner en contacto la célula hospedadora del punto 36 o 37 con un vector que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido de forma operativa al segmento de ADN que codifica Cre, y una pluralidad de vectores que comprende cada uno un promotor unido de forma operativa a un gen de la gripe que no se expresa por la célula hospedadora; y
- 20 ii) recuperar el virus de la célula hospedadora.
44. Virus preparado mediante el procedimiento del punto 41.
- 25 45. Una célula infectada con el virus del punto 44.
46. Virus preparado mediante el procedimiento del punto 42.
47. Una célula infectada con el virus del punto 46.
48. Virus preparado mediante el procedimiento del punto 43.
49. Una célula infectada con el virus del punto 48.
- 30 50. Virus preparado mediante el procedimiento del punto 40.
51. Una célula infectada con el virus del punto 50.
52. El procedimiento del punto 40, en el que el virus recombinante comprende adicionalmente ARNv que comprende un marco de lectura abierto deseado.
- 35 53. El procedimiento del punto 43 en el que la pluralidad de vectores comprende adicionalmente un vector que comprende un promotor unido a la región no codificante 5' del virus de la gripe unida a un marco de lectura abierto deseado unido a la región no codificante 3' del virus de la gripe.
54. El procedimiento del punto 41 o 42, en el que el virus recombinante comprende adicionalmente ARNv que comprende un marco de lectura abierto deseado.
- 40 55. Una célula hospedadora, cuyo genoma se aumenta con una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica proteínas de unión a superficie de la célula hospedadora; una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unida a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica proteínas de fusión; una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica M1 del virus de la gripe; una molécula
- 45

- de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica NS2 del virus de la gripe; una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica M2 del virus de la gripe.
56. La célula hospedadora del punto 56, en la que la proteína de unión a superficie de la célula hospedadora es HA.
57. La célula hospedadora del punto 56, en la que la proteína de fusión es NA.
58. La célula hospedadora del punto 56, en la que los sitios *lox* son sitios *loxP*.
59. Una célula hospedadora, cuyo genoma se aumenta con una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica proteínas de fusión y de unión a superficie de la célula hospedadora; una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *loxP* unido a una región que codifica M1 del virus de la gripe; una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *lox* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica NS2 del virus de la gripe; y una molécula de ADN recombinante que comprende un promotor funcional en la célula hospedadora unido a un primer sitio *loxP* unido a un segmento de ADN que comprende una secuencia de parada de la transcripción unida a un segundo sitio *lox* unido a una región que codifica M2 del virus de la gripe.
60. La célula hospedadora del punto 59, en la que los sitios *lox* son sitios *loxP*.
61. Un procedimiento para preparar virus de la gripe infecciosos de replicación defectuosa, que comprende:
- i) poner en contacto la célula hospedadora de la reivindicación 55 o 59 con un virus de la gripe recombinante que comprende: ARNv que comprende un marco de lectura abierto Cre, ARNv que comprende PA, ARNv que comprende NP, ARNv que comprende PB1, ARNv que comprende PB2; y
- ii) recuperar el virus de la célula hospedadora.
62. Virus preparado mediante el procedimiento del punto 61.
63. Una célula infectada con el virus del punto 62.
64. El procedimiento del punto 61, en el que el virus recombinante comprende adicionalmente ARNv que comprende un marco de lectura abierto deseado.
65. La composición del punto 3, 4 o 19, en la que el ADNc complementario que comprende el marco de lectura abierto deseado codifica un péptido o polipéptido inmunogénico de un patógeno.
66. Un procedimiento para preparar virus de la gripe, que comprende: poner en contacto una célula con la composición del punto 65 en una cantidad eficaz para producir virus de la gripe.
67. El procedimiento del punto 66 que comprende adicionalmente aislar el virus.
68. Virus obtenido mediante el procedimiento del punto 67.
69. El procedimiento del punto 52, 53 o 64 en el que el marco de lectura abierto codifica un péptido o polipéptido inmunogénico de un patógeno.
70. Virus obtenido mediante el procedimiento del punto 69.
71. El procedimiento del punto 54 en el que el marco de lectura abierto codifica un péptido o polipéptido inmunogénico de un patógeno.
72. Virus obtenido mediante el procedimiento del punto 71.
73. Un procedimiento para inmunizar a un individuo frente a un patógeno, que comprende administrar al individuo una cantidad del virus del punto 68, 70 o 72, eficaz para inmunizar al individuo.
74. Un procedimiento que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa a un ADNc de virus de ARN con sentido positivo unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I.
75. El vector del punto 74, en el que el ADNc está en orientación sentido.

76. EL vector del punto 74, en el que el ADNc está en orientación complementaria.
77. Una composición que comprende un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa a un ADNc de virus de ARN con sentido positivo en orientación sentido unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I; y un vector que comprende un promotor de la ARN polimerasa I unido de forma operativa a un ADNc de virus de ARN con sentido positivo en orientación complementaria unido a una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I.
78. Un procedimiento para preparar virus infecciosos que comprende poner en contacto una célula hospedadora con el vector del punto 74 para producir virus infecciosos.
79. Un procedimiento para preparar virus infecciosos que comprende poner en contacto una célula hospedadora con la composición del punto 77 para producir virus infecciosos.
80. Un procedimiento para preparar el virus de la gripe, que comprende poner en contacto una célula con un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de PA del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de PB1 del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de PB2 del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de HA del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de NP del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de NA unido a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de M del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción y un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de NS del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica PA del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica PB1 del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica PB2 del virus de la gripe y un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica NP del virus de la gripe, para producir virus infecciosos.
81. El procedimiento del punto 80, que comprende adicionalmente un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica HA del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica NA del virus de la gripe, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica M1, un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica M2 del virus de la gripe, y un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica NS2 del virus de la gripe.
82. El procedimiento del punto 80 u 81 que comprende adicionalmente un vector que comprende un promotor unido a secuencias no codificantes 5' del virus de la gripe unidas a un ADNc de interés o fragmento del mismo en orientación complementaria unido a secuencias no codificantes 3' del virus de la gripe unidas a una secuencia de terminación de la transcripción.
83. El procedimiento de uno cualquiera de los puntos 80 a 82 comprende adicionalmente aislar el virus.
84. Virus obtenido mediante el procedimiento del punto 83.
85. Una célula puesta en contacto con el virus del punto 84.
86. Una célula infectada con el virus del punto 84.
87. Un procedimiento para inmunizar a un individuo frente a un patógeno, que comprende administrar al individuo una cantidad del virus de la reivindicación 84, eficaz para inmunizar al individuo.
88. Un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc que comprende al menos una porción del genoma de un virus de ARN con cadena negativa unido a una secuencia de terminación de la transcripción.
89. El vector del punto 88, en el que el ADNc es una porción de un virus de ARN de cadena sencilla no segmentado.
90. El vector del punto 88, en el que el ADNc se obtiene de virus de ARN de cadena sencilla segmentado.
91. El vector del punto 88, en el que el promotor es un promotor de la ARN polimerasa I.
92. El vector del punto 88, en el que la secuencia de terminación de la transcripción es una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I.
93. Una composición que comprende una pluralidad de vectores virales que comprenden a) al menos un vector que

comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc que comprende al menos una porción del genoma de un virus de ARN con cadena negativa unido a una secuencia de terminación de la transcripción; y b) al menos un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica al menos una proteína viral del virus de ARN con cadena negativa.

- 5 94. La composición del punto 93, en la que el promotor del vector de a) es un promotor de la ARN polimerasa I.
95. La composición del punto 93, en la que el vector de a) comprende adicionalmente una secuencia de terminación de la transcripción.
96. La composición del punto 95, en el que la secuencia de terminación de la transcripción es una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I.
- 10 97. Un procedimiento de preparación de virus que comprende poner en contacto una célula hospedadora con la composición del punto 88 para producir virus infecciosos.
98. Un procedimiento de preparación de virus que comprende poner en contacto una célula hospedadora con el vector del punto 93 para producir virus infecciosos.
99. Virus aislado mediante el procedimiento del punto de uno cualquiera de los puntos 97 o 98.
- 15 100. Uso de los virus de uno cualquiera de los puntos 18, 21, 44, 46, 48, 50, 62, 68, 70, 72, 84 o 99.

**REIVINDICACIONES**

1. Una célula puesta en contacto con una pluralidad de vectores del ortomixovirus, que comprende:

(i) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de PA del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción,

5 (ii) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de PB1 del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción,

(iii) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de PB2 del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción,

10 (iv) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de HA del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción,

(v) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de NP del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción,

(vi) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de NA del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción,

15 (vii) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de M del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción,

(viii) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un ADNc de NS del virus de la gripe unido a una secuencia de terminación de la transcripción,

20 (ix) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica un polipéptido PA de la gripe y unido a una secuencia de terminación de la transcripción,

(x) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica un polipéptido PB1 de la gripe y unido a una secuencia de terminación de la transcripción,

(xi) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica un polipéptido PB2 de la gripe y unido a una secuencia de terminación de la transcripción, y

25 (xii) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica un polipéptido NP de la gripe y unido a una secuencia de terminación de la transcripción

en donde dicha célula expresa dicho ortomixovirus.

2. La célula según la reivindicación 1, en la que la célula se pone en contacto adicionalmente con una pluralidad de vectores del ortomixovirus, que comprende:

30 (xiii) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica un polipéptido HA del virus de la gripe y unido a una secuencia de terminación de la transcripción,

(xiv) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica un polipéptido NA del virus de la gripe y unido a una secuencia de terminación de la transcripción,

35 (xv) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica un polipéptido M1 del virus de la gripe y unido a una secuencia de terminación de la transcripción,

(xvi) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica un polipéptido M2 del virus de la gripe y unido a una secuencia de terminación de la transcripción, y

(xvii) un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a un segmento de ADN que codifica un polipéptido NS2 del virus de la gripe y unido a una secuencia de terminación de la transcripción

40 en donde dicha célula expresa dicho ortomixovirus.

3. La célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, , en donde el promotor del vector es un promotor seleccionado del grupo que consiste en un promotor de la ARN polimerasa I, un promotor de la ARN polimerasa II, un promotor de la ARN polimerasa III, un promotor T7 y un promotor T3.

45 4. La célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el promotor del vector es un promotor de la ARN polimerasa I.

5. La célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el promotor del vector es un

promotor de la ARN polimerasa I humana.

- 5 6. La célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la secuencia de terminación de transcripción se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de terminación de la transcripción seleccionada entre una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa I, una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa II, una secuencia de terminación de la transcripción de la ARN polimerasa III y una ribozima.
7. La célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dos o más vectores están unidos físicamente.
- 10 8. La célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde uno o más vectores están en plásmidos separados.
9. La célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende adicionalmente la etapa de introducir al menos una mutación en uno o más del ADNc de PA de la gripe, el ADNc de PB1 de la gripe, el ADNc del PB2 de la gripe, el ADNc de HA de la gripe, el ADNc de NP de la gripe, el ADNc de NA de la gripe, el ADNc de M de la gripe o el ADNc de NS de la gripe, antes de introducir el vector en las células hospedadoras.
- 15 10. La célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende adicionalmente la etapa de introducir al menos una mutación en el ADNc de HA de la gripe antes de introducir los vectores en las células hospedadoras.
11. La célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que uno o más vectores comprenden adicionalmente secuencias no codificantes 3' y 5' de un virus de la gripe.
- 20 12. La célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que un vector codifica un péptido inmunogénico o proteína útiles como una vacuna.
13. La célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que las células son células de mamífero.
- 25 14. La célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que el ADNc está en una orientación sentido.
15. La célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que el ADNc está en una orientación antisentido.





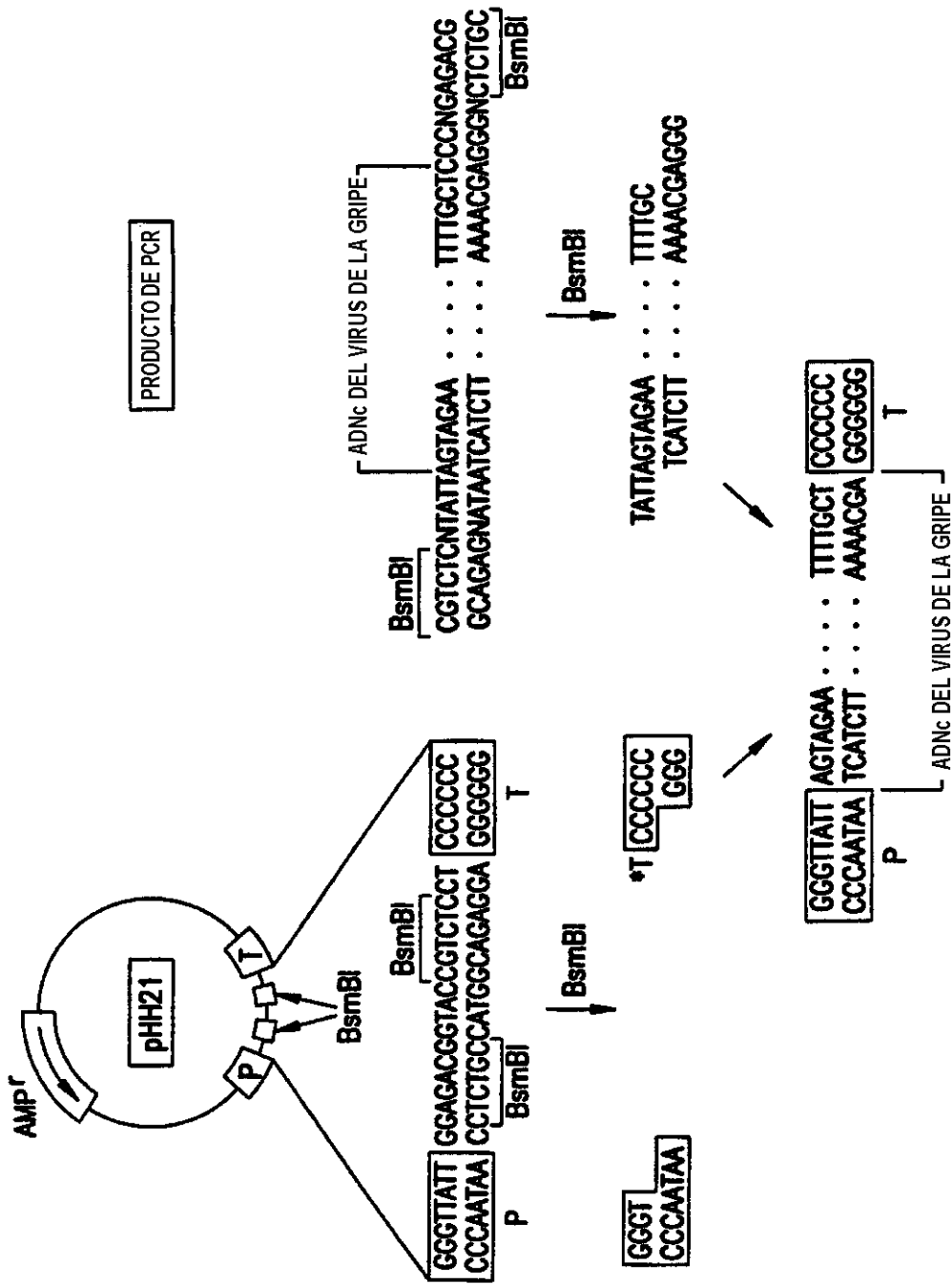


FIG. 2

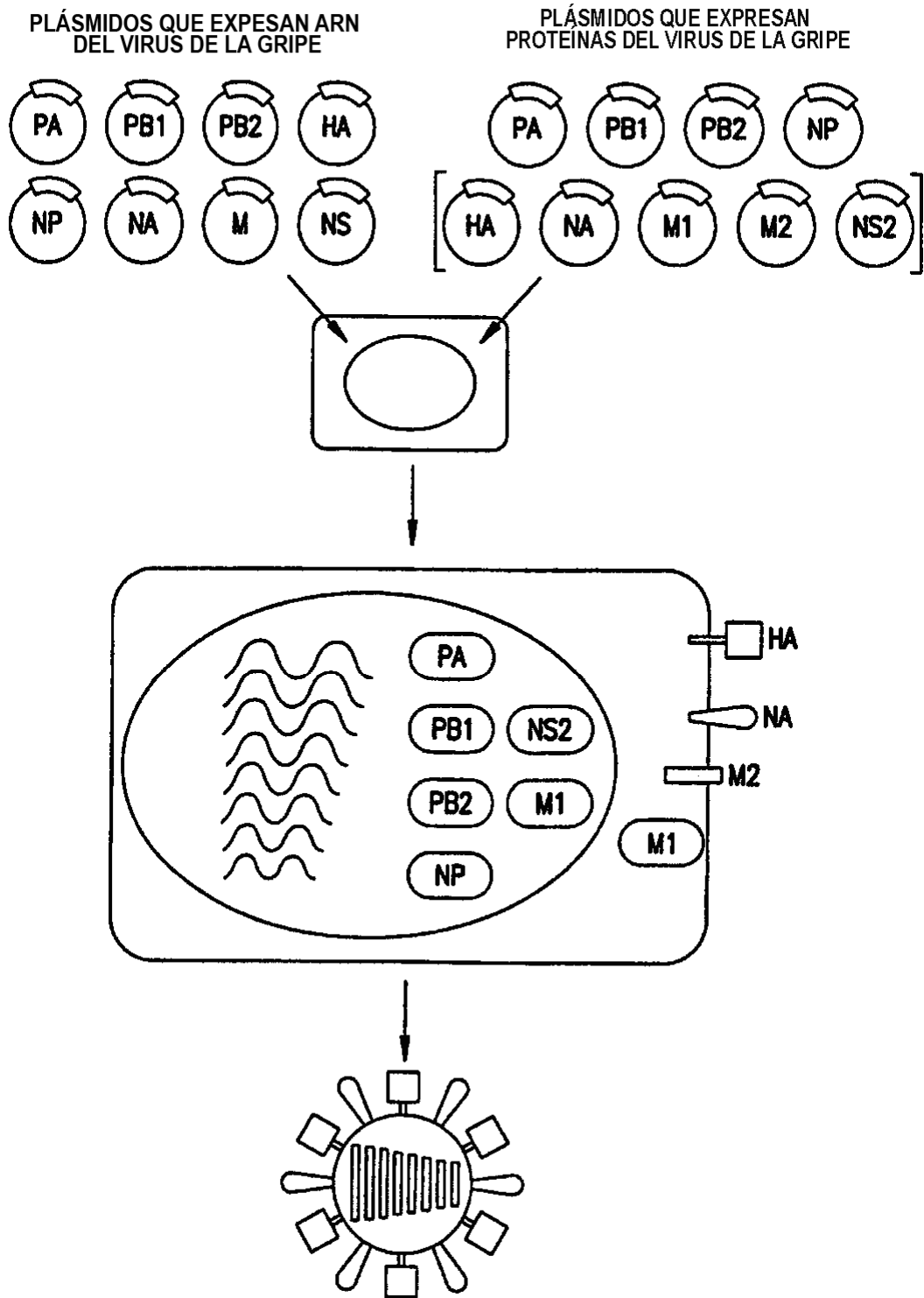


FIG. 3

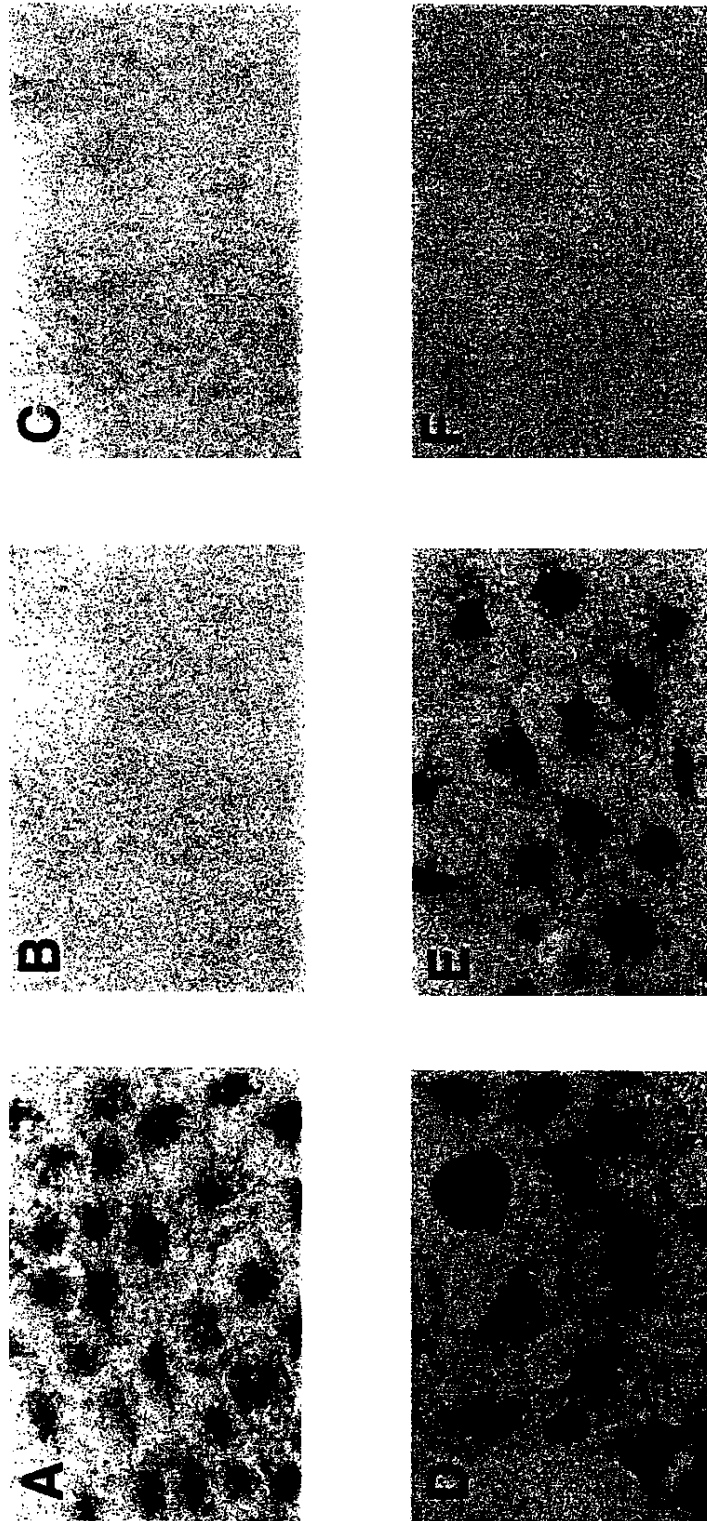


FIG. 4

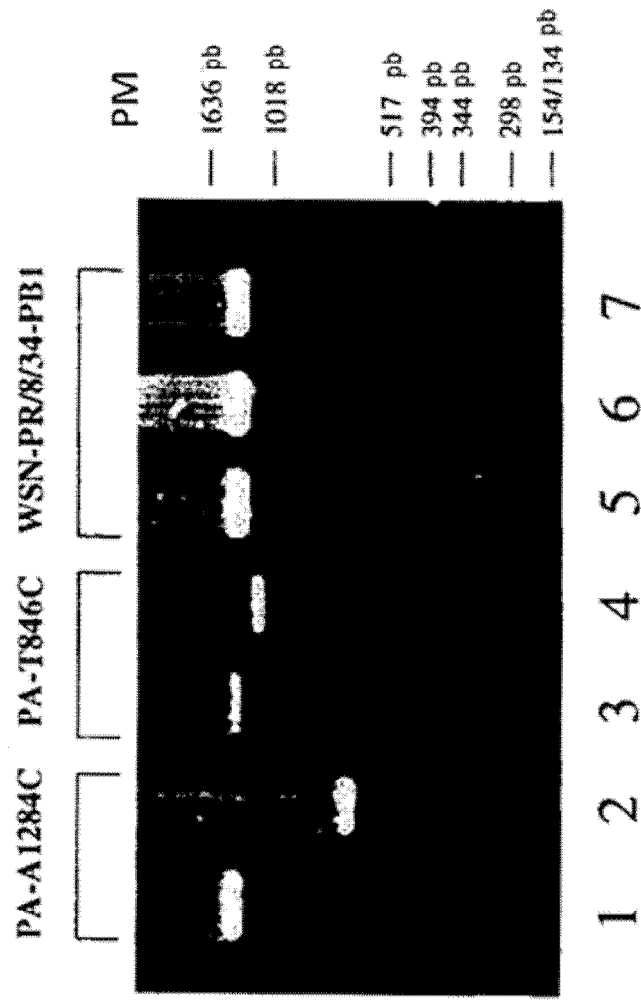


FIG. 5

Poli-5'WPB2

CAC ACA CGT CTC GTA TTA GTA GAA ACA AGG TCG TTT TTA AAC TAT TCG  
ACA CTA ATT GAT GGC CAT CCG AAT TCT TTT GG

Longitud: 80 nt

Solapamiento: 26 nt

Poli-3'WPB2

CAC ACA CGT CTC CGG GAG CGA AAG CAG GTC AAT TAT ATT CAA TAT GGA  
AAG AAT AAA AGA ACT AAG G

Longitud: 67 nt

Solapamiento: 24 nt

Poli-5'WPB1

CAC ACA CGT CTC GTA TTA GTA GAA ACA AGG CAT TTT TTC ATG AAG GAC  
AAG CTA AAT TCA CTA TTT TTG CCG TCT GAG CTC TTC AAT GG

Longitud: 89 nt

Solapamiento: 26 nt

Poli-3'WPB1

CAC ACA CGT CTC CGG GAG CGA AAG CAG GCA AAC CAT TTG AAT GGA TGT  
CAA TCC GAC TTT ACT TTT C

Longitud: 67 nt

Solapamiento: 27 nt

Poli-5'WPA

CCA ACC CGT CTC CTA TTA GTA GAA ACA AGG TAC TTT TTT GGA CAG TAT  
GGA TAG CAA ATA GTA GCA TTG CCA CAA CTA TCT CAA TGC ATG TGT GAG  
GAA GGA G

Longitud: 103 nt

Solapamiento: 25 nt

Poli-3'WPA

CCA ACC CGT CTC CGG GAG CGA AAG CAG GTA CTG ATT CAA AAT GGA AGA  
TTT TGT GCG ACA ATG CTT C

Longitud: 67 nt

Solapamiento: 27 nt

Poli-5'WHA

CAC ACA CGT CTC CTA TTA GTA GAA ACA AGG GTG TTT TTC C

Longitud: 40 nt

Solapamiento: 22 nt

Poli-3'WHA

CAC ACA CGT CTC CGG GAG CAA AAG CAG GGG AAA AT AAA AAC AAC C

Longitud: 46 nt

Solapamiento: 29 nt

FIG. 6A

Poli-5'WNP

CAC ACA CGT CTC CTA TTA GTA GAA ACA AGG GTA TTT TTC TTT AAT TG  
 Longitud: 47 nt Solapamiento: 30 nt

Poli-3'WNP

CAC ACA CGT CTC CGG GAG CAA AAG CAG GGT AGA TAA TCA CTC  
 Longitud: 42 nt Solapamiento: 26 nt

Poli-5'WNA

CAC ACA CGT CTC CTA TTA GTA GAA ACA AGG AGT TTT TTG AAC AAA C  
 Longitud: 46 nt Solapamiento: 29 nt

Poli-3'WNA

CAC ACA CGT CTC CGG GAG CGA AAG CAG GAG TTT AAA TGA ATC CAA ACC  
 Longitud: 48 nt Solapamiento: 32 nt

Poli-5'WM

CAC ACA CGT CTC CTA TTA GTA GAA ACA AGG TAG TTT TTT ACT CCA GC  
 Longitud: 47 nt Solapamiento: 30 nt

Poli-3'WM

CAC ACA CGT CTC CGG GAG CAA AAG CAG GTA GAT ATT GAA AG  
 Longitud: 41 nt Solapamiento: 26 nt

Poli-5'WNS

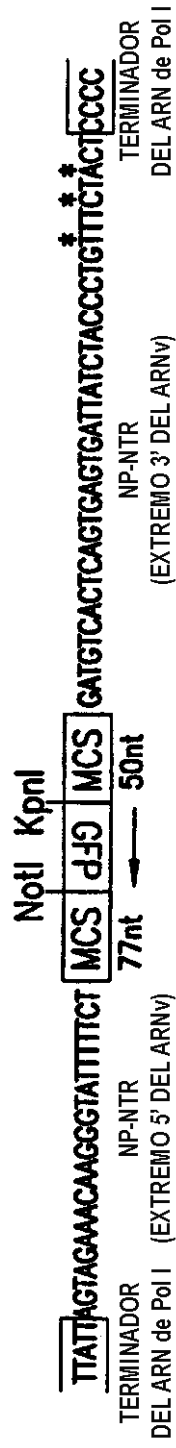
CAC ACA CGT CTC CTA TTA GTA GAA ACA AGG GTG TTT TTT ATT ATT AAA  
TAA GC  
 Longitud: 53 nt Solapamiento: 36 nt

Poli-3'WNS

CAC ACA CGT CTC CGG GAG CAA AAG CAG GGT GAC AAA GAC ATA ATG G  
 Longitud: 46 nt Solapamiento: 30 nt

Cursiva: secuencia de reconocimiento de BsmBI  
 Subrayado: secuencia del virus de la gripe  
 Subrayado + negrita: región codificadora del virus de la gripe

**FIG. 6B**



**FIG. 7**

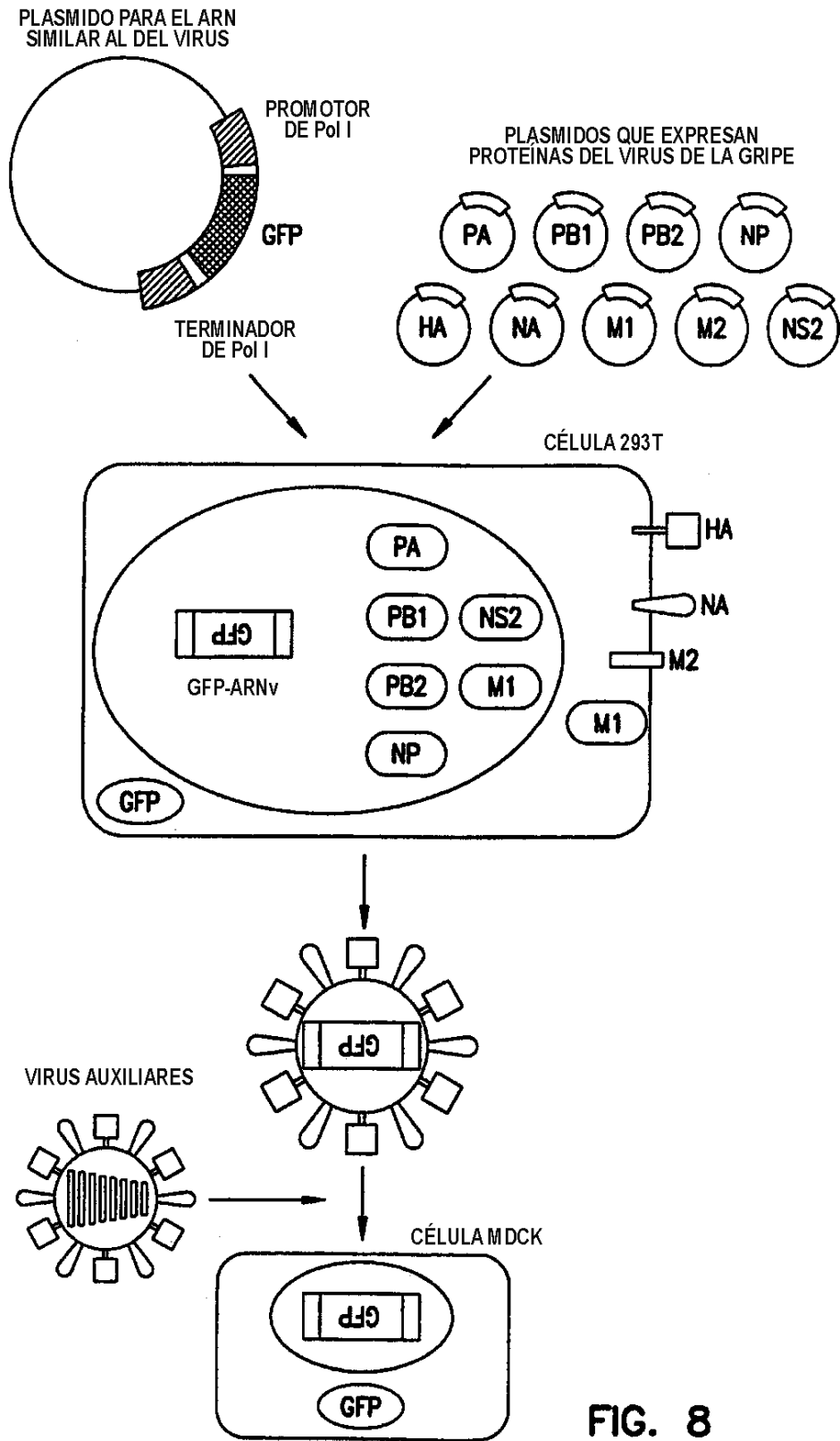


FIG. 8



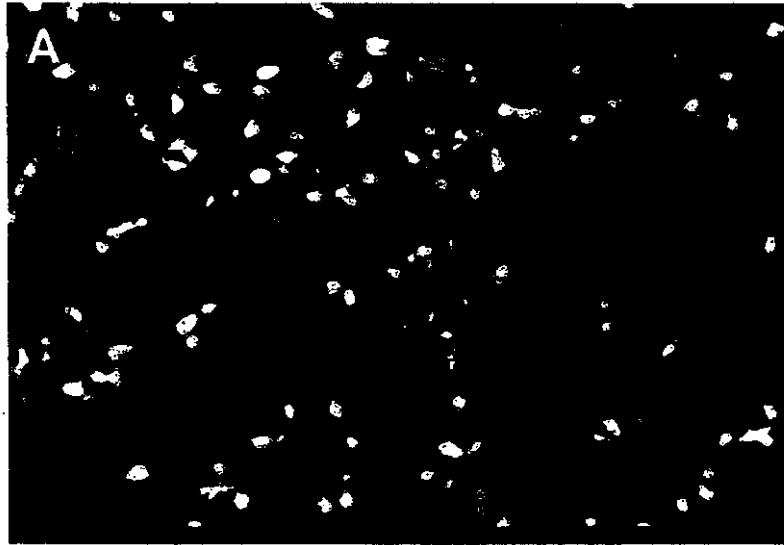
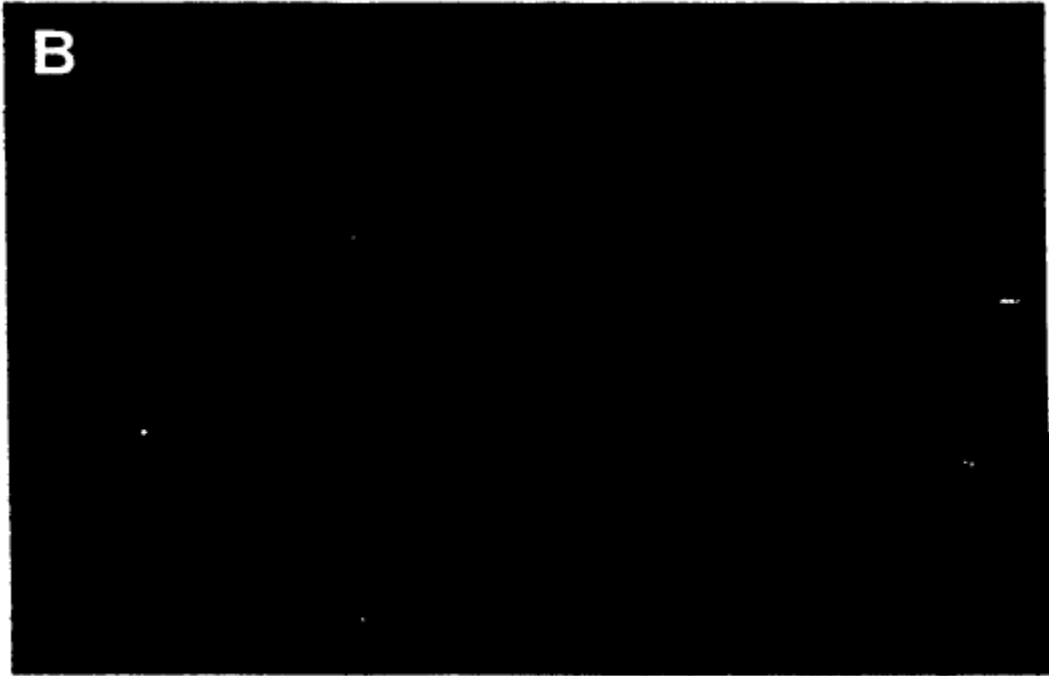
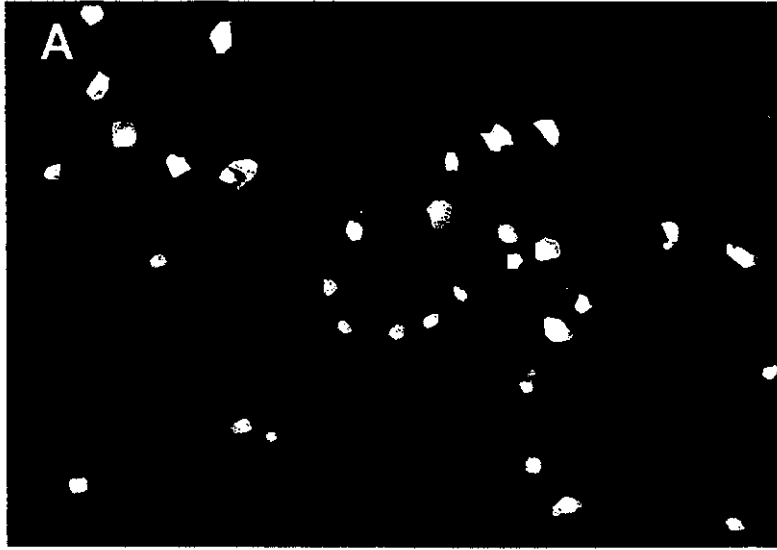


FIG. 9A



**FIG. 9B**



**FIG. 10A**

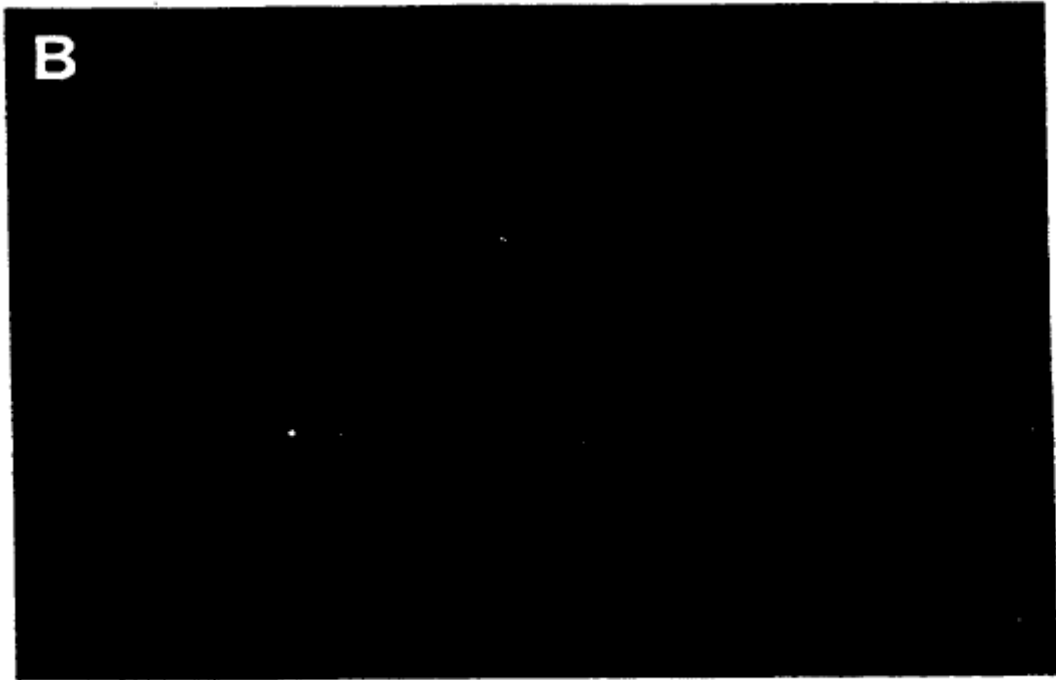


FIG. 10B

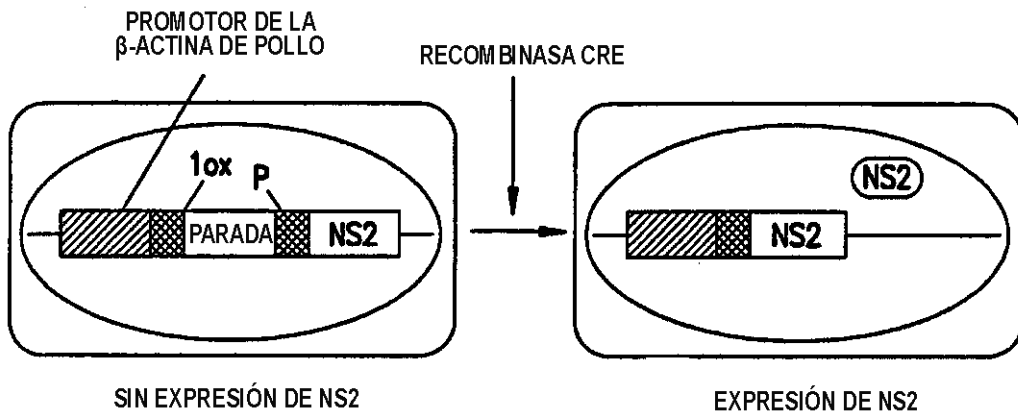


FIG. 11

